Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Untersuchungen über die enzymatische Bestimmung von Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid im Blut

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
RUTHILD MANAVI

— 1969 —

Dekan: Professor Dr. med. H. Witter
Referent: Priv. Doz. Dr. med. W. Leppla

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. F. Doenecke

Untersuchungen über die enzymatische Bestimmung von Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid im Blut

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
DER HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
RUTHILD MANAVI
— 1969 —

Dekan: Professor Dr. med. H. Witter
Referent: Priv. Doz. Dr. med. W. Leppla

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 3. Juli 1969 abgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. EINLEITUNG 1

I. Entdeckung und chemische Struktur von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat 1

II. Bedeutung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat im intermediären Stoffwechsel 4

III. Mögliche diagnostische und therapeutische Bedeutung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid 1o

B. PROBLEMSTELLUNG 12

C. METHODIK DER ENZYMATISCH-PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON DIHYDRO-NAD 13

I. Prinzipien der enzymatisch-photometrischen Bestimmung von Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid 13

II. Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Bestimmung nach KLINGENBERG 14

D. VERWENDETE REAGENTIEN 19

E. VERWENDETE GERÄTE 2o

F. ERGEBNISSE 21

I. Orientierende Dihydro-NAD-Bestimmungen im Blut 21

II. Fehlersuche bei der Dihydro-NAD-Bestimmung 22

1. Versuche zur Wiederfindung von zugesetztem Dihydro-NAD 22

Seite

a) Dihydro-NAD-Zusatz zu Blut 23

b) Dihydro-NAD-Zusatz zu Überstand 25

c) Dihydro-NAD-Zusatz zu Puffer 28

2. Versuche zur Wiederfindung von Dihydro-NAD im kinetischen Test nach KLINGENBERG ohne Zusatz von alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochlorid 31

3. Stabilitätsuntersuchungen des Dihydro-NAD in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 37

4. Untersuchungen über den Einfluß von alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochlorid auf die Dihydro-NAD-Bestimmung 39

5. Versuche zur Dihydro-NAD-Bestimmung mit gereinigter KOH 68

6. Versuche zur Dihydro-NAD-Bestimmung mit alkoholischer NaOH 72

7. Versuche zur pH-Situation bei der Dihydro-NAD-Bestimmung 74

G. DISKUSSION 77

H. ZUSAMMENFASSUNG 81

I. LITERATURVERZEICHNIS 82

A. EINLEITUNG

I. Entdeckung und chemische Struktur von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

Der Nachweis der Glukosespaltung in einem Versuchsansatz mit zellfreiem Hefepreßsaft durch E. BUCHNER im Jahre 1897 bewies erstmalig die Unabhängigkeit dieses biochemi-

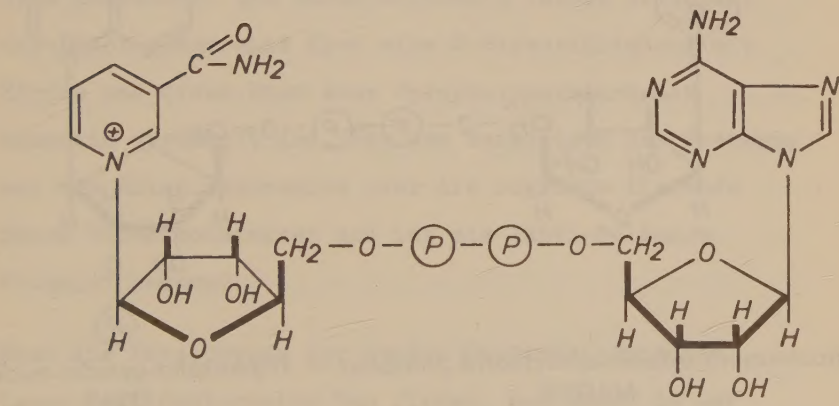
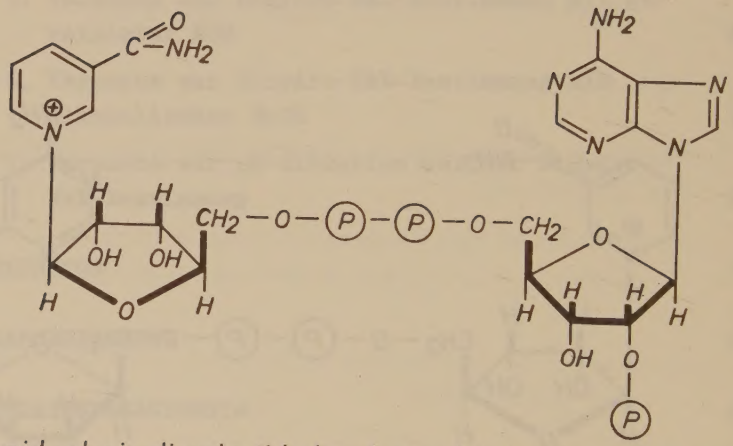


Abb. 1: Strukturformel von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (nach KARLSON (8))

schen Vorganges von der Zellstruktur. HARDEN und YOUNG (1) konnten 1904 die Zymase, wie BUCHNER das die Zuckergärung katalysierende Prinzip des Hefeextraktes nannte, durch Ultrafiltration in einen hochmolekularen, nicht dialysierbaren Anteil - die eigentliche Zymase -



Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat = *Triphospho-pyridin-nucleotid*
NADP⊕ = *TPN⊕*

Abb. 2: Strukturformel von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
(nach KARLSON (8))

und in eine niedermolekulare, hitzestabile und wasserlösliche Fraktion - das "Coenzym der Gärung" - auftrennen. Die Isolierung dieses Coenzyms gelang H.v. EULER und Mitarb. 1931 (2). WARBURG und CHRISTIAN (3, 4) isolierten eine ähnliche Verbindung aus den Erythrocyten des Pferdeblutes. In den Abbildungen 1 und 2 werden die Strukturformeln der von EULER und WARBURG (5, 6, 7) isolierten Coenzyme wiedergegeben. Wie die Strukturformeln der Coenzyme zeigen, unterscheiden sich die beiden Substanzen durch ein Molekül Phosphorsäure am Ribosemolekül. Alle übrigen Komponenten der Coenzyme sind identisch. Die Strukturformeln lassen erkennen, daß Nikotinsäureamid über eine N-Glykosidbindung mit Ribose und diese über eine Pyrophosphorsäure mit Adenosin verknüpft ist. Von den Bausteinen der Coenzyme hat das Nikotinsäureamid oder die zugrunde liegende Säure Vitamincharakter und ist als "Anti-Pellagra-Vitamin" bekannt.

Über die Bezeichnung der beiden Coenzyme herrschte lange Zeit Unklarheit. Man findet, besonders in der älteren Literatur, vier Synonyme für diese Substanzen:

1. Co-Zymase und Phospho-Co-Zymase
2. Co-Dehydrogenase I und II oder Co-Dehydrase I und II
3. Co-Enzym I und II (abgekürzt Co I und Co II)

4. Diphosphopyridinnucleotid und Triphosphopyridinnucleotid (abgekürzt DPN und TPN)

Während die zuerst genannten Bezeichnungen keine Auskunft über die Chemie der Substanzen geben, sind die Bezeichnungen DPN und TPN inkorrekt. Heute werden auf Grund der Bemühungen der 'Encyme Commission of the International Union of Biochemistry' und der 'Biological Chemistry Nomenclature Commission of the International Union of Pure and Applied Chemistry' die Bezeichnungen NICOTINAMID-ADENIN-DINUCLEOTID (NAD) und NICOTINAMID-ADENIN-DINUCLEOTID-PHOSPHAT (NADP) vorgeschlagen. Die hydrierten Formen werden mit DIHYDRO-NAD und DIHYDRO-NADP bezeichnet (9). So wird einerseits eine korrekte Strukturbezeichnung gegeben, andererseits wird der Teil des Moleküls angegeben, welcher reduziert wird.

II. Bedeutung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat im intermediären Stoffwechsel

Nach der üblichen Definition des Katalysators wäre von NAD und NADP als Coenzymen zu erwarten, daß sie wie das Trägerprotein durch die enzymatische Reaktion chemisch nicht verändert werden. Dies ist jedoch nicht der Fall,

da NAD bzw. NADP während der enzymatischen Reaktion von der oxydierten in die reduzierte Form übergehen. Erst in einer zweiten Reaktion erfolgt die Re-Oxydation und somit die Rückführung in den ursprünglichen Zustand. Infolgedessen ist die Bezeichnung der Nicotinamid-Dinucleotide als Coenzyme nicht ganz korrekt. Es werden deshalb in der neueren Literatur Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat in oxydierter und hydrierter Form als "Co-Substrate" bezeichnet. Dieser Begriff charakterisiert die Stellung des NAD-NADP-Systems zwischen den Coenzymen und den Substraten.

Die reversible Aufnahme von Wasserstoff durch NAD vollzieht sich am Pyridinring in 4-Stellung. Durch die Fixierung des Substrates ist die Auflösung der aromatischen Struktur des Pyridinrings bedingt. Für das aus dem Substrat kommende Proton besteht nun die Möglichkeit der Einnahme einer alpha- oder beta-Stellung am Pyridinring. Alpha-Addition wird bei der Dehydrierung des Äthylalkohols und der Milchsäure, beta-Addition bei der Dehydrierung durch die Glukosedehydrogenase und die Triosedehydrogenase beobachtet (1o, 11).

NAD und NADP können als Wasserstoffakzeptoren mit zahlreichen Trägerproteinen reagieren (Tabelle 1). Dem NAD

kommt bei den in Tabelle 1 aufgeführten enzymatischen Reaktionen die größere Bedeutung zu.

Substrat	Dehydrierte Verbindung	Code-hydrogenase	Nähere Angab über d. Ferm s. Seite:
Milchsäure	Brenztraubensäure	DPN	290, 292
Äpfelsäure	Oxalessigsäure	DPN od. TPN	262, 276
Äthylalkohol	Acetaldehyd	DPN	292
Phosphoglycerinaldehyd . .	1,3-Diphosphoglycerinsäure	DPN	287
Glutaminsäure	α-Ketoglutarsäure + NH_3	DPN od. TPN	380
Glucose-6-phosphat	Phosphogluconsäure	DPN	241, 307
Isocitronensäure	Oxalbernsteinsäure	DPN od. TPN	265, 277

Tabelle 1: Zusammenstellung einiger Dehydrogenasen mit ihren Co-Substraten (nach LEUTHARDT (12))

In der Reaktionsfolge der Atmungskette, die aus hintereinandergeschalteten Redoxsystemen besteht, sind die be-

teiligten Coenzyme entsprechend ihren Redoxpotentialen angeordnet. Am Anfang des Systems, das den Substratwasserstoff über verschiedene Zwischenstufen zur Reaktion bringt, steht das Redoxpaar NAD - Dihydro-NAD (E_o' = - o,32o V). Die in der Atmungskette folgenden Redoxpaare haben, wie zu erwarten, ein kleineres negatives Normalpotential. Die Bedeutung der Atmungskette liegt in der Möglichkeit, die verschiedenen Redoxsysteme auf jeder Stufe mit anderen Reaktionen zu koppeln. So kann ein Teil der freien Energie der Wasserbildung, die pro Mol 57 kcal beträgt, für den Organismus gewonnen und in energiereichen Verbindungen gespeichert werden. Es erhebt sich die Frage, ob die Atmungskette prinzipiell auch von dem Co-Substrat NADP ausgehen könnte. In diesem Zusammenhang wurde von KAPLAN und Mitarb. (13) darauf hingewiesen, daß der Wasserstoff direkt vom NADP auf NAD durch eine Transhydrogenase übertragen werden kann. Ein Teil des Substratwasserstoffs kann allerdings auch direkt auf die Flavinenzyme übergehen. Dieser Weg des Substratwasserstoffs macht im gesamten Stoffwechsel jedoch nur einen geringen Anteil aus. RAPOPORT (14) wies darauf hin, daß es noch weitere Möglichkeiten einer Verbindung zwischen den beiden Co-Substrat-Systemen NAD und NADP geben kann. Eine Möglichkeit besteht in der wechselseitigen Reaktion mit Enzymen geringer Coenzymspezifität,

eine andere Möglichkeit ist gegeben durch Kopplung zweier Enzyme mit unterschiedlichen Coenzymen und gleichem Substrat.

Der Wasserstofftransport durch die Mitochondrienmembran zur Atmungskette erfolgt durch z.B. alpha-Glycerophosphat und beta-Hydroxybutyrat (Abb. 3).

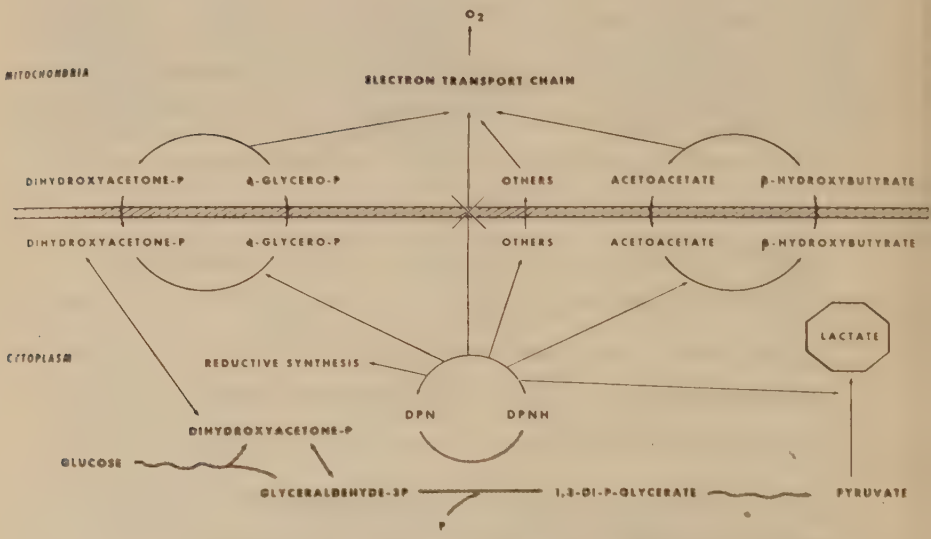


Fig. 3. Pathways of intracellular hydrogen transport.

Abb. 3: Mechanismen des Wasserstofftransportes durch die Mitochondrienmembran nach BOXER und DEVLIN (15)

Wasserstoffdonator für diese Metabolite ist Dihydro-NAD, für welches die Mitochondrienmembran impermeabel ist. KAPLAN und Mitarb. (13, 16) beschreiben zusätzlich für den Wasserstofftransport durch die Mitochondrienmembran ein spezifisches Dihydro-NAD-NAD-Transhydrase-System und bezeichnen es als "DPN-DPN-Transhydrase".

Auch bei Dehydrogenasen, die nicht an bestimmte Zellstrukturen gebunden sind und sich als lösliche Enzyme aus den Geweben extrahieren lassen, übernehmen meist NAD und NADP die Rolle der Wasserstoffionenakzeptoren. Eine wichtige Ausnahme von dieser Substratdehydrierung durch Pyridin-Co-Substrate ist die Oxydation der Bernsteinsäure zur Fumarsäure durch die Succinyloxydase.

Aus dem bisher Beschriebenen geht hervor, daß die meisten organischen Substrate Wasserstoff an NAD und NADP abgeben. Die ständige Oxydierung von Dihydro-NAD zu NAD ist die Voraussetzung für die Erhaltung der Fließgleichgewichte.
Besondere Funktionen des NAD im Stoffwechsel ergeben sich aus der Beziehung des Co-Substrates zu den Vitaminen. MARTIUS (17) wies nach, daß die Vitamin-K-Reduktase oder Phyllochinonreduktase in Lebermitochondrien den Wasserstoff des Co-Substrats Dihydro-NAD auf

das Vitamin K überträgt. Diese Vitamin-K-Reduktase ist durch Dicumarin hemmbar. Hiermit ist möglicherweise die Wirkung der Antikoagulantien zu erklären. Fermente ähnlicher Wirkung wurden in Colibakterien und auch in Erbsen nachgewiesen (18, 19).

NASON und LEHMANN (2o) zeigten, daß die durch Cytochrom c bedingte Oxydation der Dihydro-Co-Substrate durch Vitamin E beschleunigt wird. Es ist nicht geklärt, ob dem Tocopherol dabei vielleicht die Rolle eines Wasserstoffüberträgers zufällt.

LEUTHARDT (12) betont die Bedeutung der Oxydation des Dihydro-NAD bei der Atmungskettenphosphorylierung.

III. Mögliche diagnostische und therapeutische Bedeutung von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid und Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid

Über die Bedeutung des NAD in bösartigen Tumoren sowie bei bestimmten Leukämieformen und über sein Verhalten unter Cytostaticagabe liegen mehrere Untersuchungen vor (21, 22, 23, 24, 25, 26). HOLZER (27) diskutiert die Möglichkeit einer alkylierenden Wirkung der Carcinostatica auf Nicotinsäureamid. Hierdurch kann das Nicotin-

säureamid der NAD-Synthese entzogen werden.
WIELAND (28) machte einen Anstieg des Dihydro-NAD-Spiegels der Leber für die Ketonkörperbildung bei stärkerer Fettsäureverbrennung verantwortlich.
Eine mögliche therapeutische Bedeutung der Substanz NAD bei der Behandlung des Leberkomas wird diskutiert (29).
Die große Bedeutung der Nikotinsäure bei der konservativen Therapie von Durchblutungsstörungen und bei der Behandlung von Hypercholesterinämien sowie bei der Aktivierung der Fibrinolyse soll auf der Funktion der Nikotinsäure als Ausgangssubstanz bei der NAD-Biosynthese beruhen (3o).

Die bisherigen Ausführungen beschrieben die zentrale Stellung von NAD und Dihydro-NAD im Stoffwechsel. Das Ziel dieser Arbeit ist nicht, einen vollständigen Überblick über Funktion und Bedeutung von NAD und Dihydro-NAD zu geben.

B. PROBLEMSTELLUNG

Bei dem Versuch einer weiteren Charakterisierung der irreversiblen Milchsäureacidose des Menschen durch klinisch-chemische Befunde ergab sich in unserem Laboratorium das Bedürfnis zur Einführung einer Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut. Die im Schrifttum angegebenen Methoden zur Dihydro-NAD-Bestimmung in Blut und Geweben sind

1. enzymatisch-photometrische Verfahren (31, 32, 33, 34, 35, 36, 37)
2. fluorometrische Verfahren (38, 39, 40).

Bei der Auswahl des Verfahrens waren die Gesichtspunkte der Praktikabilität im Routinelaboratorium maßgebend. KLINGENBERG (37) hat 1962 ein enzymatisch-photometrisches Verfahren zur Bestimmung von Dihydro-NAD im Blut angegeben. Dieses Verfahren wird in der vorliegenden Untersuchung einer näheren Prüfung unterzogen.

C. METHODIK DER ENZMATISCH-PHOTOMETRISCHEN BESTIMMUNG VON DIHYDRO-NAD

I. Prinzipien der enzymatisch-photometrischen Bestimmung von Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid

Die publizierten Methoden zur enzymatisch-photometrischen Bestimmung von Dihydro-NAD in Geweben und Blut beruhen prinzipiell auf der Messung der Lichtabsorption von Dihydro-NAD im ultravioletten Bereich. Dihydro-NAD zeigt im Bereich zwischen 3oo und 4oo nm ($1o^{-9}$ m) ein Absorptionsmaximum bei 34o nm. Der spezifische Absorptionskoeffizient von Dihydro-NAD ist bei 366 nm nur etwa halb so groß wie bei 34o nm (3,3 x $1o^6$ cm^2/Mol bzw. 6,22 x $1o^6$ cm^2/Mol). Als Maß für die Dihydro-NAD-Konzentration einer Probe wird die Abnahme der Lichtabsorption (Zunahme der Durchlässigkeit) bei vollständiger oxydativer Umwandlung des Dihydro-NAD in NAD benutzt. Das entstehende NAD zeigt im Bereich zwischen 3oo und 4oo nm keine Lichtabsorption (41). Die vollständige Umwandlung von Dihydro-NAD in NAD wird z.B. gemäß der Reaktion

$$\text{Pyruvat} \xrightarrow[\text{Dihydro-NAD} \longrightarrow \text{NAD}]{\text{LDH}} \text{Lactat}$$

durch Zugabe von Pyruvat und Lactatdehydrogenase (LDH) zur Probe erreicht.

Notwendige Reagentien

1. Äthanol, absol., p. a.
2. Kaliumhydroxyd, p. a.
3. Triäthanolamin-hydrochlorid
4. Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4, p. a.
5. Dikaliumhydrogenphosphat, K_2HPO_4, p. a.
6. Ammoniumsulfat, p. a.
7. Natriumpyruvat
   Handelspräparate s. S. 1007.
8. Lactat-Dehydrogenase, LDH
   aus Skelettmuskel kristallisiert, Suspension in 2,1 M Ammoniumsulfat-Lösung. Handelspräparate s. S. 985.

Abb. 4: Reagentien zur Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

II. Dihydro-Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Bestimmung nach KLINGENBERG

Im folgenden ist die Beschreibung des methodischen Vorgehens bei der von KLINGENBERG (37) angegebenen Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut wiedergegeben (Abb. 4 bis Abb. 8).

Herstellung der Lösungen

I. Alkoholische Kalilauge (0,5 N):
2,8 g KOH mit einer Mischung gleicher Volumenteile Äthanol und bidest. Wasser ad 100 ml lösen.

II. Alkoholische Kalilauge (1,0 N):
5,6 g KOH in 100 ml Äthanol lösen.

III. Triäthanolamin-HCl-Phosphat-Mischung (0,5 M Triäthanolamin; 0,4 M KH_2PO_4; 0,1 M K_2HPO_4):
9,30 g Triäthanolamin-hydrochlorid, 5,44 g KH_2PO_4 und 1,74 g K_2HPO_4 mit bidest. Wasser ad 100 ml lösen.

IV. Triäthanolamin-HCl (1 M):
18,6 g Triäthanolamin-hydrochlorid mit bidest. Wasser ad 100 ml lösen.

V. Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung:
ca. 80 g $(NH_4)_2SO_4$ bei Raumtemperatur mit bidest. Wasser ad 100 ml suspendieren, unter gelegentlichem Rühren einige Stunden stehen lassen. Bodenkörper nicht entfernen.

VI. Pyruvat (1 M):
1,10 g Natriumpyruvat mit bidest. Wasser ad 10 ml lösen.

VII. Lactat-Dehydrogenase, LDH (0,5 mg Protein/ml):
Stammsuspension mit 2,1 M Ammoniumsulfat-Lösung entsprechend verdünnen.

Haltbarkeit der Lösungen

Alle Lösungen sind, verschlossen im Kühlschrank aufbewahrt, monatelang haltbar.

Abb. 5: Vorschriften zur Lösungsherstellung bei der Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

Blut ohne Erhitzen enteiweißen. Zur Vermeidung zu starker Verdünnung konzentriertere alkoholische KOH verwenden. Für je 1 ml Blut in Zentrifugengläsern 0,5 ml 1 N alkoholische KOH (Lösung II) vorlegen. Unter kräftigem Rühren das Blut einspritzen. 5 min bei Raumtemperatur stehen lassen, dann im Eisbad kühlen. Unmittelbar anschließend zur Ausfällung des Hämochromogens aus der tiefbraunen Lösung pro ml des Ansatzes 0,5 ml gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung (V) und zur Neutralisation 0,2 ml Triäthanolamin-HCl-Lösung (IV) einrühren. p_H soll ca. 7,8 sein. Denaturiertes Protein abzentrifugieren (10 min bei 10000 g). Weitgehend klaren Extrakt unverdünnt zur Messung verwenden.

Abb. 6: Beschreibung der Aufarbeitung von Blut zur Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

Bestimmungsansatz

Meßstrahlung: 340 oder 334 mμ (nicht 366 mμ); Schichtdicke: 2 cm oder 4 cm; Meßvolumen 2,01 ml; (bei 4 cm Schichtdicke: 4,02 ml; dabei alle Lösungsvolumina verdoppeln!); Raumtemperatur. — Messungen gegen Vergleichsküvette mit verdünnter Kaliumdichromat-Lösung zur Kompensation der Färbung und Trübung der Extrakte.

Nacheinander in die Küvette pipettieren:

2,000 ml Extrakt
0,005 ml Pyruvat-Lösung (VI)

mischen, Extinktion E_1 ablesen,

0,005 ml LDH-Suspension (VII)

einmischen, nach etwa 3 min Endwert der Extinktion E_2 ablesen.
$\Delta E = E_1 - E_2$ geht in die Berechnung ein.

Abb. 7: Bestimmungsansatz zur photometrischen Messung bei der Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

Berechnung

Es ist

$$\frac{\Delta E \cdot 2{,}04}{d \cdot \varepsilon} \left(1 + \frac{V_2}{V_1}\right) \left(1 + \frac{V_4 + V_5}{V_3}\right) = \mu\text{Mol DPN/ml Untersuchungsmaterial,}$$

wenn d = Schichtdicke der Küvette [cm]
ε = Extinktionskoeffizient für DPNH [cm²/μMol]; bei 340 mμ: 6,22; bei 366 mμ: 3,30
V_1 = Volumen des Untersuchungsmaterials = Gewicht/Dichte
V_2 = Zur Enteiweißung benötigte ml $HClO_4$
V_3 = Nach der Enteiweißung entnommener Überstand [ml]
V_4 = Zugefügte ml K_2HPO_4-Lösung
V_5 = Bei der Neutralisation verbrauchte ml KOH
2,04 = Volumen des Testansatzes [ml].

Die DPN-Menge in der Küvette ist $\frac{\Delta E \cdot 2{,}04}{d \cdot \varepsilon}$. Diese wird mit Verdünnungsfaktoren multipliziert, so daß man DPN pro Volumeneinheit des Untersuchungsmaterials erhält.
Da die Dichte der Gewebe und des Blutes nahezu 1 ist, können Gewicht (in g) und Volumen (in ml) praktisch gleichgesetzt werden. Damit wird DPN/ml ≈ DPN/g.

Abb. 8: Berechnungsansatz für die NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

Bezüglich der Berechnung der Konzentration von Dihydro-NAD ergibt sich bei sinngemäßer Umwandlung der KLINGENBERG'schen Formel für die NAD-Bestimmung (siehe Abb. 8) folgender Ansatz:

$$\frac{\Delta E \cdot 2.02}{1 \cdot 6.22} \left(1 + \frac{V_2}{V_1}\right) \left(1 + \frac{V_4 + V_5}{V_3}\right)$$

$$= \text{/}\mu\text{Mol NADH pro ml Untersuchungsmaterial}$$

V1 = Volumen des Untersuchungsmaterials

V2 = zur Enteiweißung benötigte KOH

V3 = nach Enteiweißung entnommener Überstand in ml

V4 = zugefügte ml $(NH_4)_2SO_4$ - Lösung

V5 = bei der Neutralisation verbrauchtes Triäthanolamin-hydrochlorid

Hieraus ergibt sich:

$$\frac{\Delta E \cdot 2.02}{1 \cdot 6.22} \left(1 + \frac{1}{2}\right) \left(1 + \frac{1.5 + 0.6}{2.0}\right) = \text{/}\mu\text{Mol/ml}$$

$$\Delta E \cdot 0.3248 \cdot 1.5 \cdot 2.05 = \text{/}\mu\text{Mol/ml}$$

$$\Delta E \cdot 0.9988 = \text{/}\mu\text{Mol/ml}$$

Eine schematische Übersicht über das methodische Vorgehen ist in Tabelle 2 dargestellt.

Menge		Substanz	Behandlungsvorschrift
1.o	ml	alkohol. KOH	
2.o	ml	Blut	
			5 Minuten stehen lassen bei Raumtemperatur. Danach in ein Eisbad stellen.
1.5	ml	gesättigte Ammoniumsulfat-lösung	
o.6	ml	Triäthanolamin-hydrochlorid-lösung	
			Zentrifugation. Danach Abpipettieren des klaren Überstandes.
2.o	ml	klarer Überstand in Küvette	
o.o1o	ml	Pyruvatlösung	
			Ablesen der Extinktion E_1
o.o1o	ml	LDH-Suspension	
			Nach frühestens 3 Minuten (Ende der Reaktion) ablesen der Extinktion E_2. Berechnen von $E_1-E_2 = \Delta E$

Tabelle 2: Schematische Übersicht über das methodische Vorgehen bei der Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut

D. VERWENDETE REAGENTIEN

1. Äthanol absol. p.a. MERCK 969
2. Kaliumhydroxyd p.a. MERCK 5o33
3. Triäthanolaminhydrochlorid p.a. FLUKA 9o29o
4. Ammoniumsulfat p.a. MERCK 1217
5. Natrium-Pyruvat BOEHRINGER 15685
6. Lactat-Dehydrogenase des Biochemica-GPT-Test TC-H-II 15956 TGAK BOEHRINGER
7. Natriumhydroxyd p.a. MERCK 6498
8. Kaliumdihydrogenphosphat p.a. MERCK 4873
9. Dinatriumhydrogenphosphat p.a. MERCK 658o
10. Silbernitrat p.a. MERCK 1512

E. VERWENDETE GERÄTE

1. Mikroliterpipetten MARBURG der Firma NETHELER & HINZ GmbH Hamburg
2. Verschließbare Probenbecher zum Mikrolitersystem der Firma NETHELER & HINZ GmbH Hamburg
   bzw. Einmal-Plastik-Reagensgläser
3. Zentrifuge zum Mikrolitersystem der Firma NETHELER & HINZ GmbH Hamburg
   bzw. Zentrifuge CHRIST JUNIOR 1 S
   (3ooo U/min. 1o Minuten)
4. Das erforderliche Eisbad wurde mit Hilfe eines Kryomaten TK 3o D des MEßGERÄTEWERK LAUDA (Dr. Wobser KG) in einem externen Wasserbad mit einer entsprechenden Kühlschlange erzeugt (Badflüssigkeit Methanol).
5. Spektralphotometer BECKMAN DB
6. 1 cm Quarzküvetten
7. Als Registriereinrichtung Lin/Log Varicord Recorder Modell 43 der Firma PHOTOVOLT CORP. New York
   (Lieferfirma KONTRON AG München)

F. ERGEBNISSE

I. Orientierende Dihydro-NAD-Bestimmungen im Blut

In den ersten orientierenden Blutuntersuchungen mit der beschriebenen Methode und dem in Tabelle 2 beschriebenen Vorgehen mußten folgende Feststellungen getroffen werden:

1. Eine Extinktionsabnahme wurde nicht beobachtet. Teilweise wurden Extinktionszunahmen gemessen.
2. Ein Teil der Proben wurde trotz identischer Aufbereitung haemolytisch, so daß nach Zentrifugation die Extrakte wegen nicht meßbarer hoher Eigenextinktion bei der benutzten Wellenlänge nicht zur weiteren Messung verwendet werden konnten.

Bei dem Versuch, durch Zusatz von Dihydro-NAD zum Blut die zu erwartende Extinktionsabnahme ΔE drastisch zu erhöhen, wurden teilweise keine Extinktionsabnahmen und teilweise geringe Extinktionsabnahmen registriert. Bei dieser Art von Wiederfindungsversuchen wurden insgesamt nur sehr geringe Mengen von zugesetztem Dihydro-NAD wiedergefunden. Die Einzelbestimmung war nicht reproduzierbar. In diesen Versuchen wurde ebenfalls unvorhersehbar Haemolyse eines Teiles der Proben beobachtet.

Um die unvorhersehbare Haemolyse von Erythrocyten bei

dem beschriebenen methodischen Vorgehen auszuschalten, wurden in weiteren orientierenden Versuchen zunächst Serum, später Biseko^{R} * im Versuchsansatz als Probe benutzt. Eine weitere Verwendung dieser Ausgangsmaterialien war jedoch nicht möglich, da Überstände von Serum und Biseko nach Enteiweißung eine nicht mehr meßbare hohe Eigenextinktion bei der benutzten Wellenlänge haben.

II. Fehlersuche bei der Dihydro-NAD-Bestimmung

Nach dem unbefriedigenden Verlauf der Bemühungen zur Einführung einer Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut in die Routinediagnostik begann eine systematische Fehlersuche.

1. Versuche zur Wiederfindung von zugesetztem Dihydro-NAD

Bei diesen Untersuchungen wurde zunächst zu Blut, später zu Überstand Dihydro-NAD-Lösung in m/15 Sörensen-Puffer (Na_2HPO_4; KH_2PO_4) pH 7.5 zugesetzt. In einer weiteren Variation dieser Untersuchungen wurde Dihydro-NAD-Eichlösung (in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5) als Probe in den Versuchsansatz eingebracht. Hierbei handelt es sich also nicht im strengen Sinn um Recovery-Versuche, da die Dihydro-NAD-Konzentrationen in dem untersuchten Blut und im untersuchten Überstand nicht bekannt sind. Wegen der

---

* Eingetragenes Warenzeichen der Firma "BIOTEST"

unvorhersehbaren Haemolyse von Blut bei der methodischen Aufbereitung wäre die Verwendung von Serum und Biseko^{R} als Ausgangsmaterial bei diesen Untersuchungen sinnvoll gewesen. Wie jedoch bereits früher festgestellt wurde, haben Überstände von Serum und Biseko^{R} bei der benutzten Wellenlänge eine nicht mehr meßbare hohe Eigenextinktion.

a) Dihydro-NAD-Zusatz zu Blut

Von vier verschiedenen Probanden wurde Blut in üblicher Weise durch Punktion einer Vena cubitalis gewonnen. Zu 9.o ml des Blutes wurden sofort 1.o ml einer 1oo mg/ 1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung pH 7.5 (m/15 Sörensen-Puffer) pipettiert. Die Konzentration von Dihydro-NAD im Blut wurde damit um 1o mg/1oo ml bzw. o.15o7 /uMol/ml erhöht. Von diesem Blut wurden 2.o ml nach dem in Tabelle 2 beschriebenen methodischen Vorgehen bis zur Zentrifugation aufbereitet. Der nach der Zentrifugation erhaltene Überstand wurde nach Zugabe von o.o1o ml Pyruvatlösung und nach Zugabe von o.o1o ml LDH-Suspension photometriert. Die durch den Dihydro-NAD-Zusatz im Blut zu erwartende theoretische Extinktionsabnahme $\Delta E_{theor.}$ beträgt o.151. Die Konzentrationsberechnung von Dihydro-NAD bei diesen Blutuntersuchungen erfolgte nach der auf Seite 17 angegebenen Formel. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

	Proband 1			Proband 2			Proband 3	Proband 4			
E_1	0.490	0.740	0.760	0.355	0.330	0.998	0.295	0.845	0.800	0.825	0.660
E_2	0.510	0.730	0.885	0.355	0.395	0.971	0.295	0.845	0.780	0.825	0.660
ΔE	+0.030	-0.010	+0.125	0.000	+0.065	-0.027	0.000	0.000	-0.020	0.000	0.000
Dihydro-NAD [µMol/ml Blut]	?	0.01	?	0.0	?	0.027	0.0	0.0	0.02	0.0	0.0

Tabelle 3: Versuche zur Wiederfindung von zum Blut zugesetztem Dihydro-NAD

Bei allen vier Probanden wurde ein Teil der Proben - wie schon früher beobachtet - haemolytisch. Diese Haemolyse war an der Rotfärbung des Überstandes nach Zentrifugation zu erkennen. Sie trat völlig unvorhersehbar auf. Von den theoretisch möglichen 5 Einzelbestimmungen je Proband sind in Tabelle 3 nur die Ergebnisse von denjenigen Versuchsansätzen dargestellt, bei denen keine maximale Haemolyse beobachtet wurde. Proben mit geringfügiger Haemolyse wurden gemessen und sind an höheren Extinktionen E_1 zu erkennen. Aus den Konzentrationsangaben in /uMol/ml Blut in Tabelle 3 ist zu ersehen, daß Dihydro-NAD, welches menschlichem Blut zugesetzt wurde, in unseren Untersuchungen mit der Methode nach KLINGENBERG nur teilweise in sehr geringen und schwankenden Anteilen wiedergefunden wird. Teilweise wurden entgegen den Erwartungen unerklärliche Extinktionszunahmen beobachtet. In keinem Fall wurde eine Dihydro-NAD-Konzentration gemessen, die in etwa der zugesetzten Dihydro-NAD-Menge von o.15o7 /uMol/ml bzw. 1o mg/1oo ml entspricht.

b) Dihydro-NAD-Zusatz zu Überstand

Frisch aus der Vena cubitalis entnommenes Blut wurde nach dem methodischen Vorgehen nach KLINGENBERG (Tab. 2) bis zur Zentrifugation aufbereitet. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Überstände wurden nur dann weiter-

verwendet, wenn makroskopisch keine Haemolyse feststellbar war. Zu 9.o ml nicht haemolytischer Überstände einer Versuchsperson wurde 1.o ml einer 1oo mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung pH 7.5 (m/15 Sörensen-Puffer) pipettiert. Die Dihydro-NAD-Konzentration im Überstand wurde durch diesen Zusatz um 1o mg/1oo ml bzw. o.15o7 /uMol/ml erhöht. Diese Ansätze aus Dihydro-NAD-Lösung und Überstand wurden vor der Extinktionsmessung eine Stunde lang im Eisbad bei + 4 Grad Celsius verschlossen aufbewahrt. Diese Zeit entspricht der Aufbereitungszeit von Blutproben bis zur photometrischen Messung. 2.o ml der so vorbereiteten Lösung wurden im kinetischen Test gemessen. Die durch den Dihydro-NAD-Zusatz zu erwartende theoretische Extinktionsabnahme $\Delta E_{theor.}$ beträgt o.9397. Die Berechnung der Dihydro-NAD-Konzentration im Überstand erfolgte nach der Formel

$$c \cdot \left[/uMol/ml \text{ Überstand} \right] = \frac{\Delta E}{6.22}$$

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 4 zusammengestellt.

E_1	1.068	0.875	0.910	0.930	0.948
E_2	0.938	0.730	0.783	0.815	0.828
ΔE	0.130	0.145	0.127	0.115	0.120
Dihydro-NAD [uMol/ml Überstand]	0.021	0.023	0.020	0.019	0.019
% Wiederfindung	14	16	13	12	13

Tabelle 4: Versuche zur Wiederfindung von zu Überstand zugesetztem Dihydro-NAD

Im Unterschied zu den Untersuchungen mit Blut wurden in diesen Versuchen meßbare Konzentrationen von Dihydro-NAD wiedergefunden. Die gemessenen Dihydro-NAD Konzentrationen liegen bei 12 - 16 % der zugesetzten Dihydro-NAD-Menge (entsprechend o.o21 - o.o23 /uMol/ml). Die Angabe der prozentualen Wiederfindung bei diesen Versuchen erscheint sinnvoll, da nach den bisherigen Ergebnissen davon auszugehen war, daß sowohl Blut-Dihydro-NAD als auch zum Blut zugesetztes Dihydro-NAD während der Aufbereitungszeit so verändert wird, daß es im photometrischen Test nach KLINGENBERG nicht mehr nachzuweisen ist. Die hier gemessenen Extinktionsabnahmen können deshalb nur durch das dem Überstand zugesetzte Dihydro-NAD verursacht sein. Die prozentuale Wiederfindung des zum Überstand zugesetzten Dihydro-NAD genügt jedoch nicht den Forderungen einer in der klinischen Chemie brauchbaren Nachweismethode.

c) Dihydro-NAD-Zusatz zu Puffer

Der bisher nicht befriedigende Verlauf von Untersuchungen zur Einführung einer Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut führte dazu, daß in den nächsten Versuchen Dihydro-NAD-Eichlösung (m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5) mit der Methode nach KLINGENBERG untersucht wurde. Hierzu wurden 2.o ml einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung mit 1.o ml alkoholischer KOH, 1.5 ml

$(NH_4)_2SO_4$ und o.6 ml Triäthanolaminhydrochloridlösung versetzt und nach Zentrifugation zur photometrischen Messung gebracht. Die Berechnung der Dihydro-NAD-Konzentration aus den registrierten Extinktionsdifferenzen erfolgte nach der Formel

$$c \cdot \left[\text{/uMol/ml Eichlösung} \right] = \frac{\Delta E}{6.22} .$$

Für die Berechnung der prozentualen Wiederfindung wurde die Verdünnung der Dihydro-NAD-Eichlösung durch das methodische Vorgehen berücksichtigt. Die Dihydro-NAD-Konzentration im zur Messung gelangenden Ansatz beträgt 3.9 mg/1oo ml bzw. o.o588 /uMol/ml, die zu erwartende theoretische Extinktionsabnahme $\Delta E_{theor.}$ o.3732. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

E_1	0.440	0.480	0.448	0.448	0.430	0.418	0.450	0.318	0.415	0.410
E_2	0.370	0.430	0.360	0.368	0.370	0.335	0.380	0.332	0.335	0.345
ΔE	0.070	0.050	0.088	0.080	0.060	0.083	0.070	0.066	0.080	0.065
Dihydro-NAD [/uMol/ml Puffer]	0.011	0.008	0.014	0.013	0.010	0.013	0.011	0.011	0.013	0.010
% Wieder-findung	19	14	24	22	17	22	19	19	22	17

Tabelle 5: Versuche zur Wiederfindung von zu m/15 Sörensen-Puffer zugesetztem Dihydro-NAD im Versuchsansatz nach KLINGENBERG (37)

Die als Eichlösung in die Methode eingebrachte Dihydro-NAD-Menge wurde bei diesen Versuchen in einem Bereich zwischen 14 und 24 % wiedergefunden. Die Unterschiede in der Extinktion E_1 können nicht erklärt werden. Dihydro-NAD wird also auch bei diesem Vorgehen zu einem erheblichen Teil dahingehend verändert, daß es im kinetischen Test nicht mehr nachzuweisen ist.

2. Versuche zur Wiederfindung von Dihydro-NAD im kinetischen Test nach KLINGENBERG ohne Zusatz von alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochlorid

Da die bisherigen Bemühungen um die Einführung der Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut erfolglos waren, wurde bei der weiteren Fehlersuche der kinetische Test ohne vorherigen Zusatz von alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochloridlösung durchgeführt. Zur Untersuchung gelangten eine 5 mg/1oo ml und eine 1o mg/1oo ml enthaltende Dihydro-NAD-Lösung in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 sowie eine 5 mg/1oo ml und eine 1o mg/1oo ml enthaltende Dihydro-NAD-Lösung in Aqua bidestillata. Die Ergebnisse wurden nach der Formel

$$c \cdot \left[\text{/uMol/ml Eichlösung} \right] = \frac{\Delta E}{6.22}$$

berechnet.

Die Dihydro-NAD-Konzentration der 5 mg/1oo ml enthaltenden Lösung entspricht o.o754 /uMol/ml, die der 1o mg/1oo ml enthaltenden Lösung o.15o7 /uMol/ml.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

	5 mg/1oo ml Puffer	5 mg/1oo ml Aqua dest.	1o mg/1oo ml Puffer	1o mg/1oo ml Aqua dest.
E_1	o.48o	o.43o	o.845	o.82o
E_2	o.1o5	o.1oo	o.11o	o.18o
ΔE	o.375	o.33o	o.735	o.643
Dihydro-NAD [uMol/ml Pufferlösung]	o.o6	o.o53	o.1181	o.1o33
% Wiederfindung	8o	7o	78	68

Tabelle 6: Versuche zur Wiederfindung von Dihydro-NAD im kinetischen Test

Entsprechende Messungen der spektralen Absorption im Wellenlängen-Bereich zwischen 38o - 32o nm sind aus den Abbildungen 9, 1o und 11 zu ersehen.

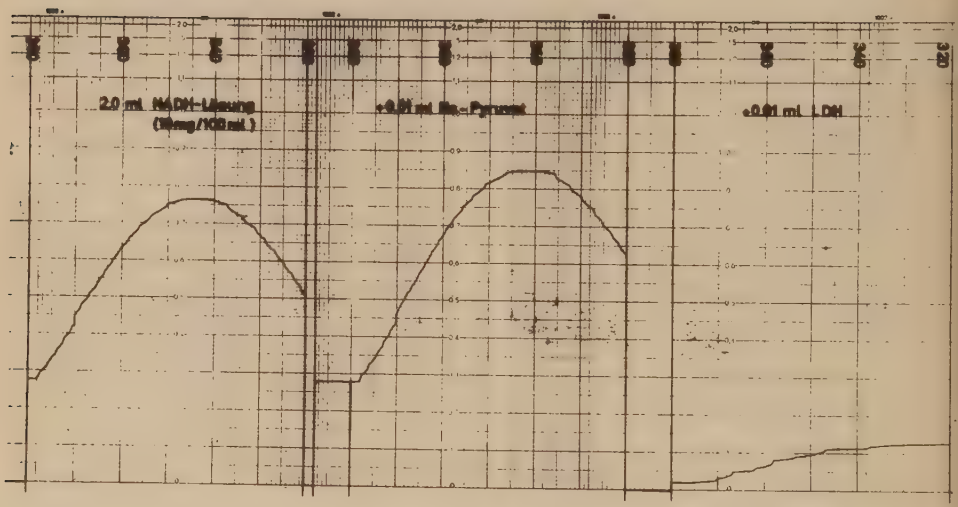


Abb. 9: Messung einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung im kinetischen Test

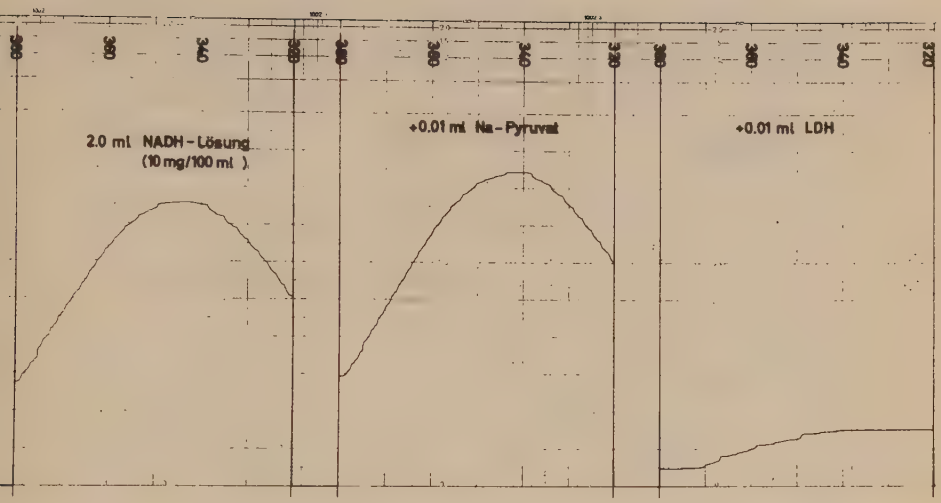


Abb. 1o: Messung einer 1o mg/1oo ml enthaltenden wässrigen Dihydro-NAD-Lösung im kinetischen Test

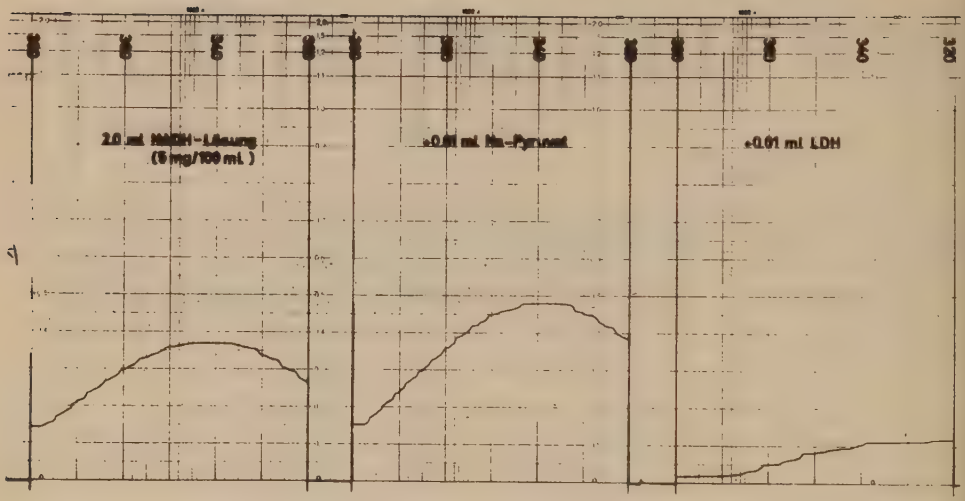


Abb. 11: Messung einer 5 mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung im kinetischen Test

Die Konzentration des Dihydro-NAD wurde um ca. 2o % bei Dihydro-NAD-Pufferlösungen und um ca. 3o % bei wässrigen Dihydro-NAD-Lösungen niedriger gefunden als es der Einwaage entspricht. Da die Firma Boehringer für ihr Dihydro-NAD-Präparat eine Reinheit von ca. 78 % angibt, ist die prozentuale Wiederfindung von 8o % in den Untersuchungen mit Dihydro-NAD-Pufferlösung erklärt. Eine Erklärung für die Wiederfindung von ca. 7o %

bei der Untersuchung von wässrigen Dihydro-NAD-Lösungen kann nicht gegeben werden. Das verwendete Aqua bidestillata hatte einen pH von 6 und keinerlei Puffereigenschaften.

3. Stabilitätsuntersuchungen des Dihydro-NAD in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5

Die weitere Fehlersuche sollte durch Stabilitätsuntersuchungen des Dihydro-NAD in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 eine Zerstörung des Co-Substrats ausschließen. Dabei wurde so vorgegangen, daß eine 3.9 mg/1oo ml enthaltende Dihydro-NAD-Lösung in m/15 Sörensen-Puffer nach dem Ansetzen zunächst 75 Minuten bei + 4 Grad Celsius gekühlt wurde und dann zu 2.o ml dieser Lösung o.o1o ml Pyruvat und o.o1o ml LDH in eine Küvette pipettiert wurden. Dieser Versuch wurde 4 Wochen später mit derselben Dihydro-NAD-Lösung noch einmal durchgeführt. Die Dihydro-NAD-Lösung wurde zwischenzeitlich bei + 4 Grad Celsius im Kühlschrank aufbewahrt. In einem zusätzlichen Versuch wurde 4 Wochen nach Ansetzen der Stammlösung der zur Messung gelangende Ansatz zunächst 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und erst dann die Reaktion gestartet. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

	75' bei + 4° C			nach 4 Wochen (sofortige Messung)			nach 4 Wochen + 45 Min. Raumtemperatur		
E_1	0.460	0.470	0.445	0.355	0.348	0.355	0.380	0.365	0.375
E_2	0.150	0.150	0.150	0.105	0.108	0.100	0.130	0.125	0.125
ΔE	0.310	0.320	0.295	0.250	0.240	0.255	0.250	0.240	0.250
Dihydro-NAD [/uMol/ml]	0.05	0.051	0.047	0.04	0.039	0.041	0.04	0.039	0.04
% Wiederfindung	83	86	79	67	65	69	67	64	67

Tabelle 7: Untersuchungen zur Stabilität von Dihydro-NAD in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5

Eine in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 frisch angesetzte Dihydro-NAD-Lösung hat im optischen Test einen Gehalt zwischen 79 und 86 %. Vier Wochen später ist die Konzentration des Dihydro-NAD auf 64 - 68 % abgesunken. Durch 45 Minuten langes Stehen des Versuchsansatzes bei Raumtemperatur ergibt sich keine zusätzliche Änderung der Dihydro-NAD-Konzentration.

4. Untersuchungen über den Einfluß von alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochlorid auf die Dihydro-NAD-Bestimmung

Aus den Ergebnissen der bisherigen Fehlersuche geht hervor, daß Dihydro-NAD in der hier untersuchten Methode nach KLINGENBERG durch andere Reaktionskomponenten als m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5, Pyruvat und LDH so beeinflußt wird, daß im kinetischen Test eine unzureichende oder keine Extinktionsabnahme beobachtet wird. In den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob bei Zugabe der einzelnen Reaktionsteilnehmer zum Dihydro-NAD enthaltenden Versuchsansatz Veränderungen der Extinktion auftreten, die in Zusammenhang mit der beobachteten Beeinflussung des Dihydro-NAD im kinetischen Test nach KLINGENBERG gebracht werden können.

Voraussetzung für eine solche Versuchsreihe ist die Kenntnis der Eigenextinktionen der einzelnen an der Aufbereitung und Reaktion beteiligten Substanzen. Diese Eigenextinktionen bei 34o nm sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Substanz	E (λ = 34o nm)
Puffer	o.ooo
1.o N alkohol.KOH	o.172
$(NH_4)_2SO_4$	o.o2o
Tri-HCl	o.ooo
Dihydro-NAD-Lösung [1o mg/1oo ml Puffer]	o.685

Tabelle 8: Eigenextinktion der einzelnen Reaktionsteilnehmer bei λ = 34o nm

Entsprechende Messungen der spektralen Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 32o nm sind aus den Abbildungen 12 bis 16 zu ersehen.

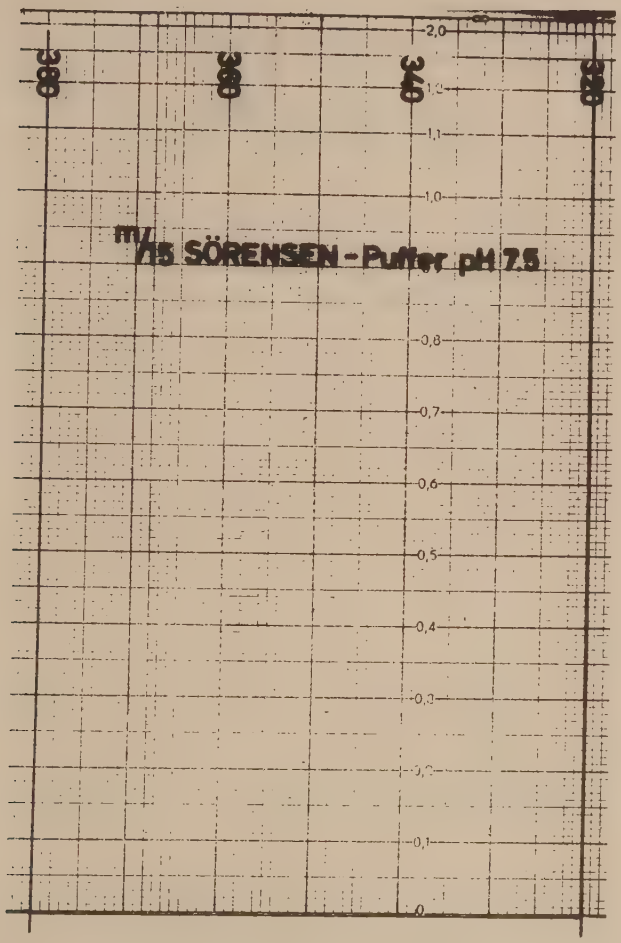


Abb. 12: Messung der spektralen Absorption von m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5

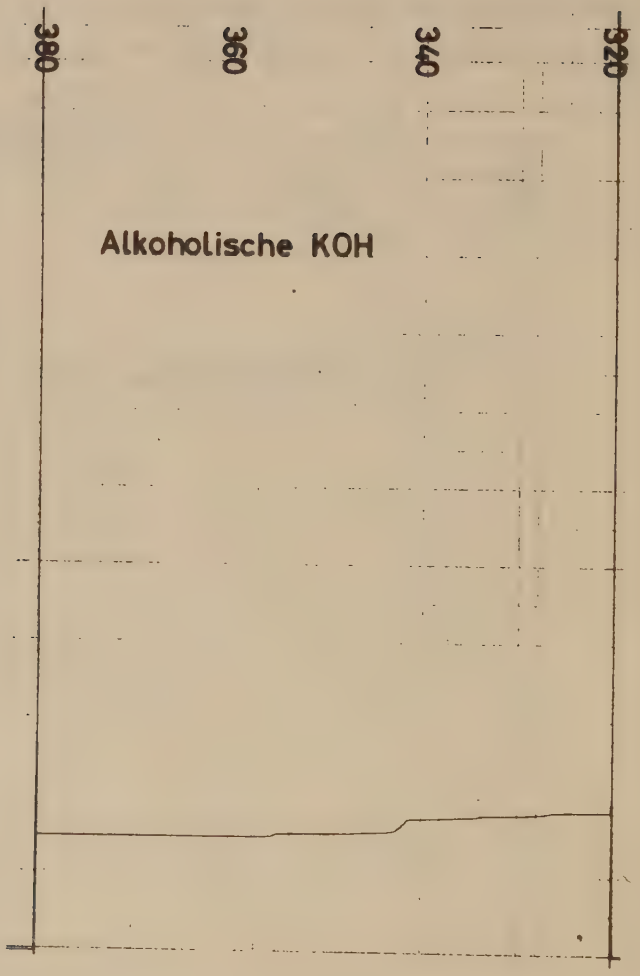


Abb. 13: Messung der spektralen Absorption einer 1.o N alkoholischen KOH

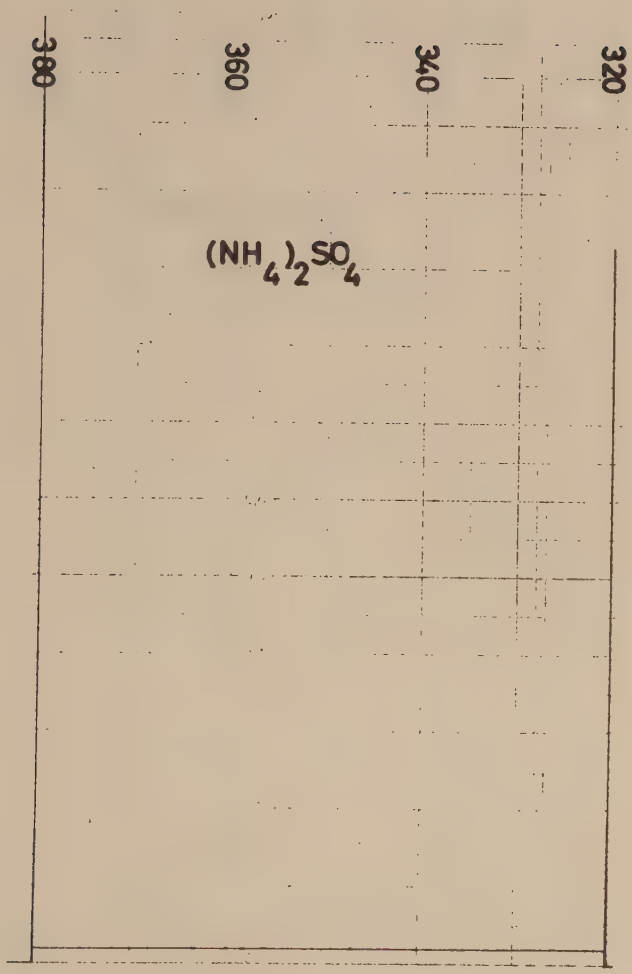


Abb. 14: Messung der spektralen Absorption einer gesättigten $(NH_4)_2SO_4$-Lösung

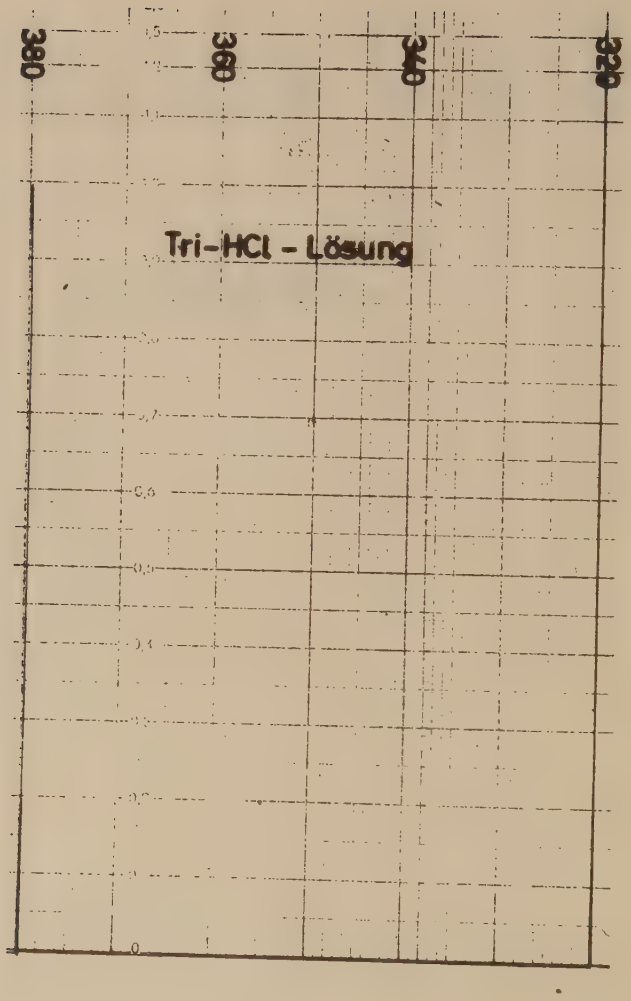


Abb. 15: Messung der spektralen Absorption einer Triäthanolaminhydrochlorid-Lösung (1 M)

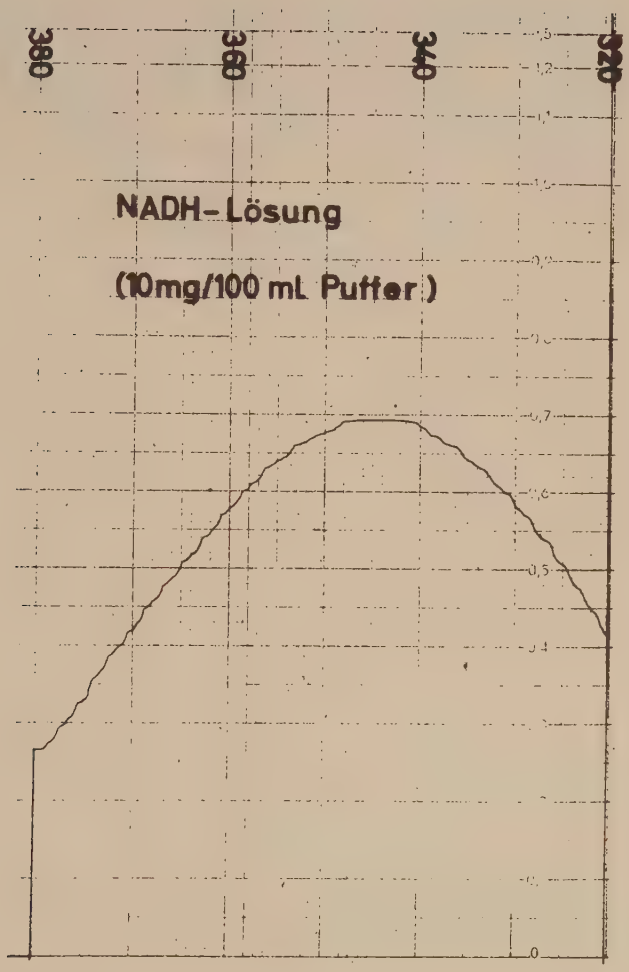


Abb. 16: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung

Tabelle 9 und 1o enthalten die Ergebnisse von Extinktionsmessungen bei 34o nm in Versuchsansätzen ohne Dihydro-NAD-Zusatz, in welchen die einzelnen Reaktionsteilnehmer entsprechend ihrer Konzentration im Versuchsansatz nach KLINGENBERG kombiniert wurden.

Substanz			E (λ = 340 nm)
1.0	ml	alkohol.KOH	
4.1	ml	Puffer	0.018
1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$	
3.6	ml	Puffer	0.000
0.6	ml	Tri-HCl	
4.5	ml	Puffer	0.000
2.01	ml	Puffer	
0.01	ml	Na-Pyruvat	0.119
0.01	ml	LDH	
2.01	ml	Puffer	0.000
0.01	ml	Na-Pyruvat	
0.01	ml	LDH	
2.00	ml	Puffer	0.138

Tabelle 9: Extinktion der einzelnen Reaktionsteilnehmer in Endkonzentration bei λ = 340 nm

Substanz			E (λ = 340 nm)
3.0	ml	Puffer	
1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$	0.020
0.6	ml	Tri-HCl	
2.6	ml	Puffer	
1.0	ml	1 N alkohol.KOH	0.020
1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$	
2.0	ml	Puffer	
1.0	ml	alkohol.KOH	
1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$	0.019
0.6	ml	Tri-HCl	

Tabelle 10: Extinktion der entsprechend dem Versuchsansatz nach KLINGENBERG kombinierten Reaktionsteilnehmer bei λ = 340 nm

Entsprechende Messungen der spektralen Absorption einzelner Reaktionsteilnehmer in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz oder der Kombination mehrerer dieser Substanzen im Bereich von 38o bis 32o nm sind aus den Abbildungen 17 bis 25 zu ersehen.

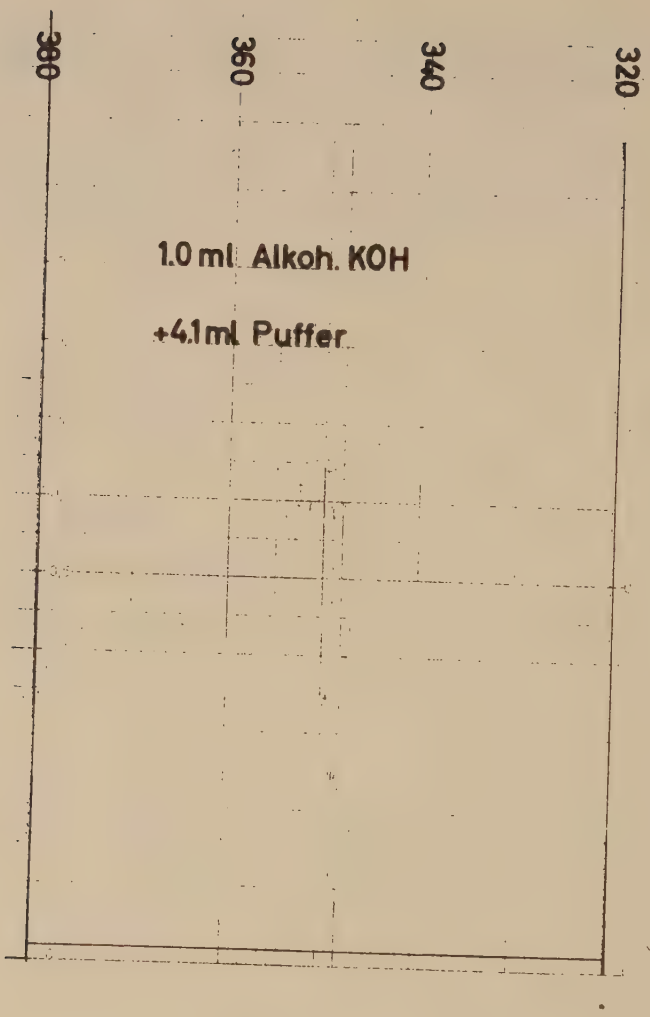


Abb. 17: Messung der spektralen Absorption einer 1.o N alkoholischen KOH in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz

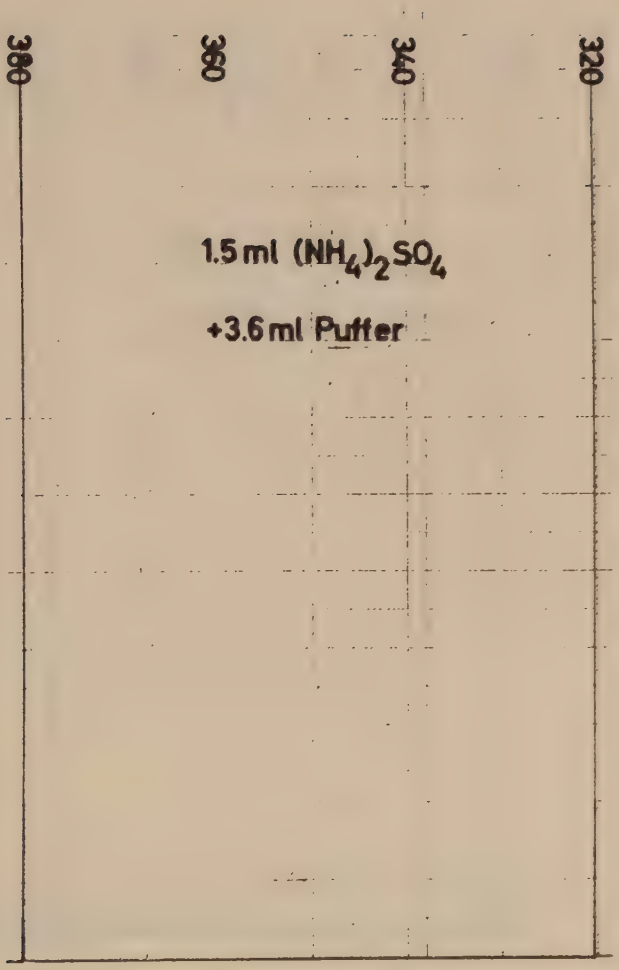


Abb. 18: Messung der spektralen Absorption einer gesättigten $(NH_4)_2SO_4$-Lösung in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz

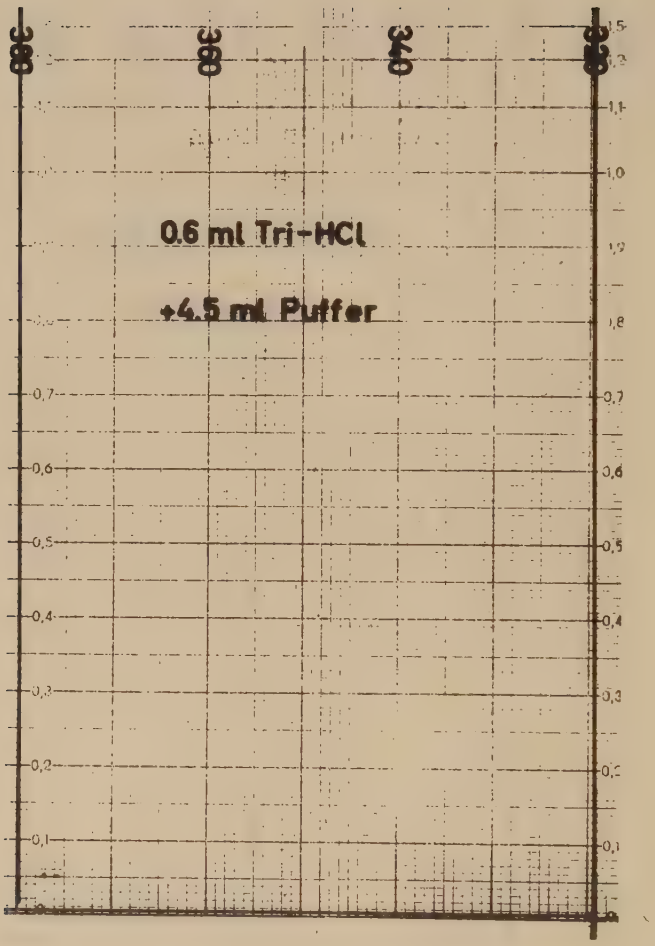


Abb. 19: Messung der spektralen Absorption einer 1 M Triäthanolaminhydrochlorid-Lösung in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz

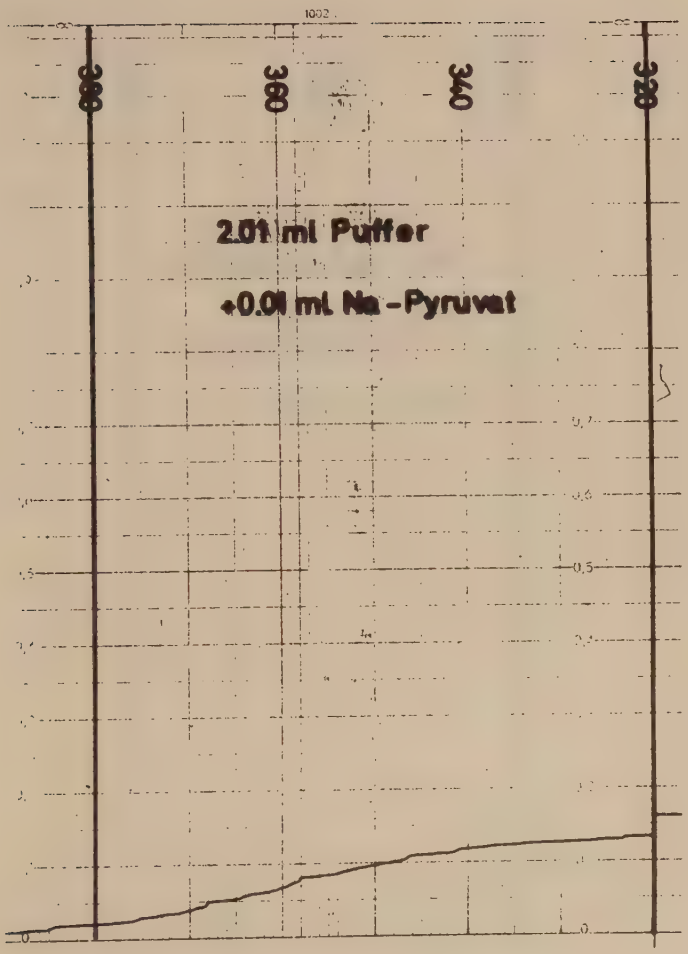


Abb. 2o: Messung der spektralen Absorption einer 1 M Natrium-Pyruvat-Lösung in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz

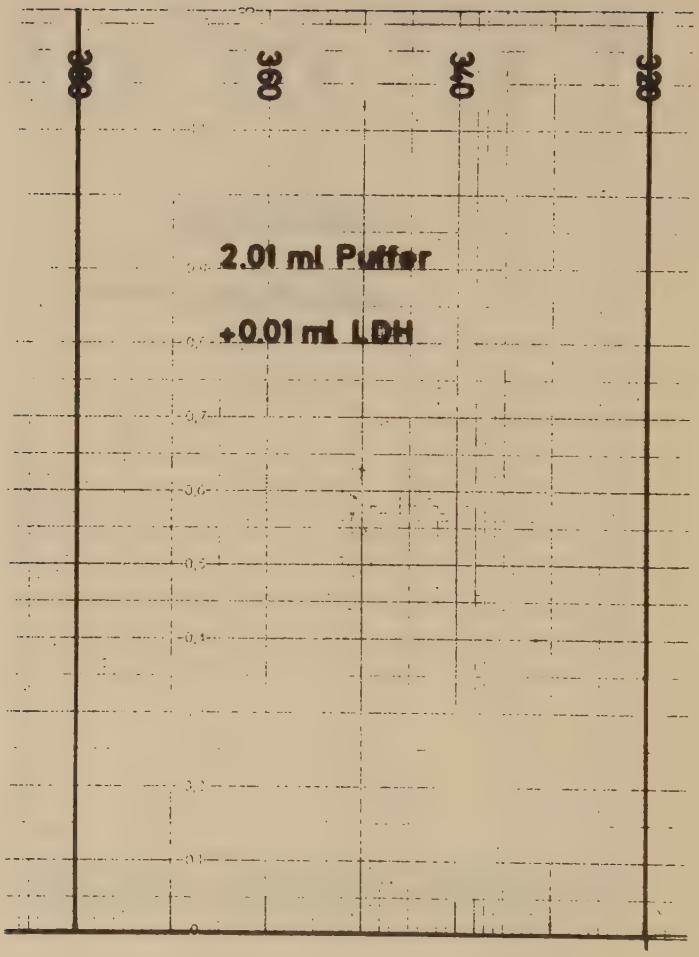


Abb. 21: Messung der spektralen Absorption von Lactat-Dehydrogenase (o.25 mg Protein/ml) in ihrer Endkonzentration im Versuchsansatz

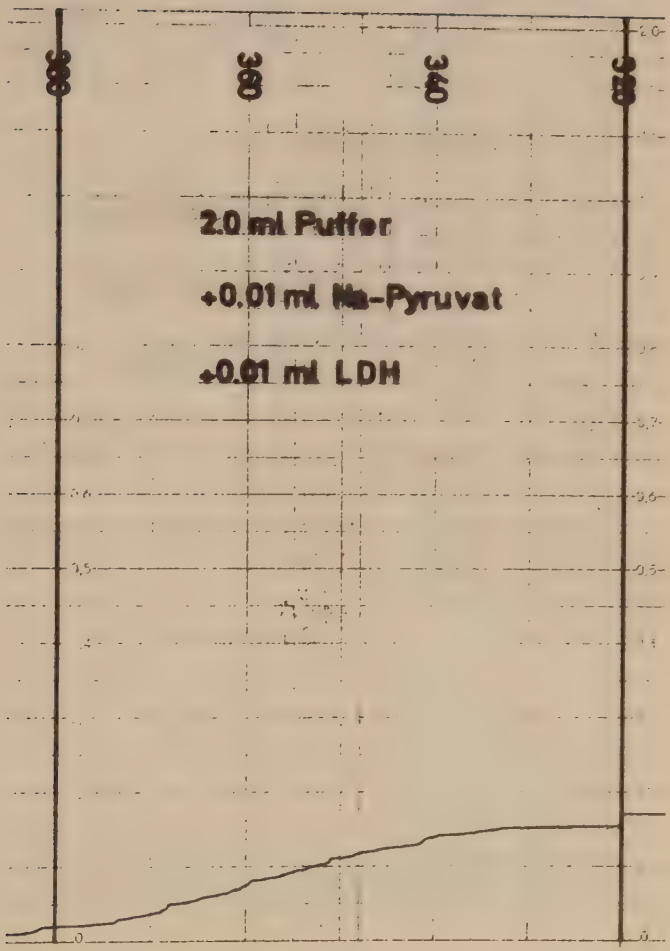


Abb. 22: Messung der spektralen Absorption einer Kombination von Na-Pyruvat und LDH entsprechend ihrer Konzentration im Versuchsansatz

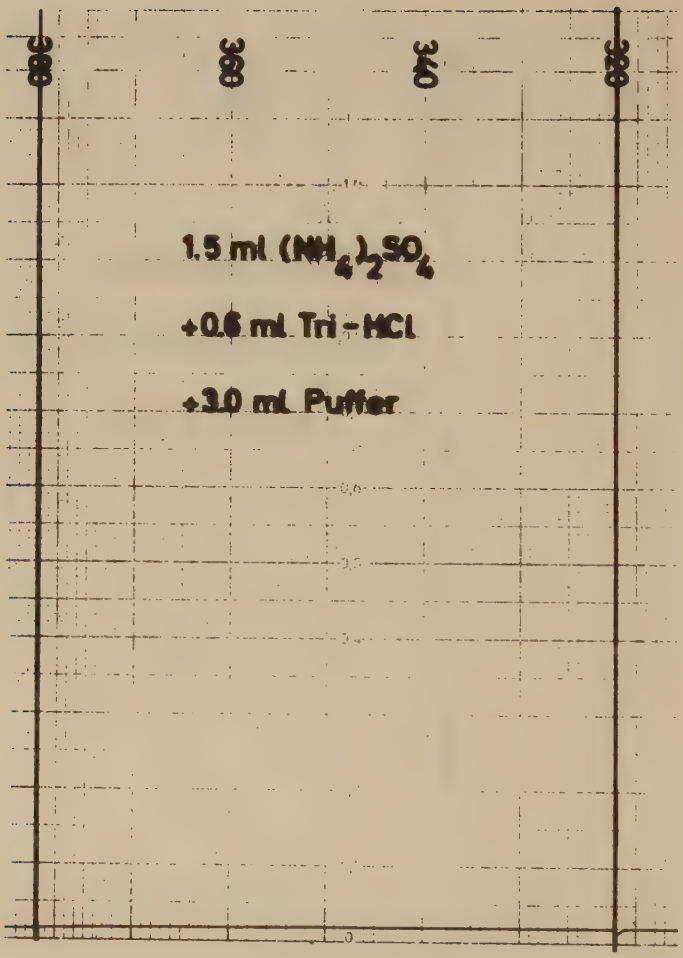


Abb. 23: Messung der spektralen Absorption einer Kombination von $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolamin-HCl entsprechend ihrer Konzentration im Versuchsansatz

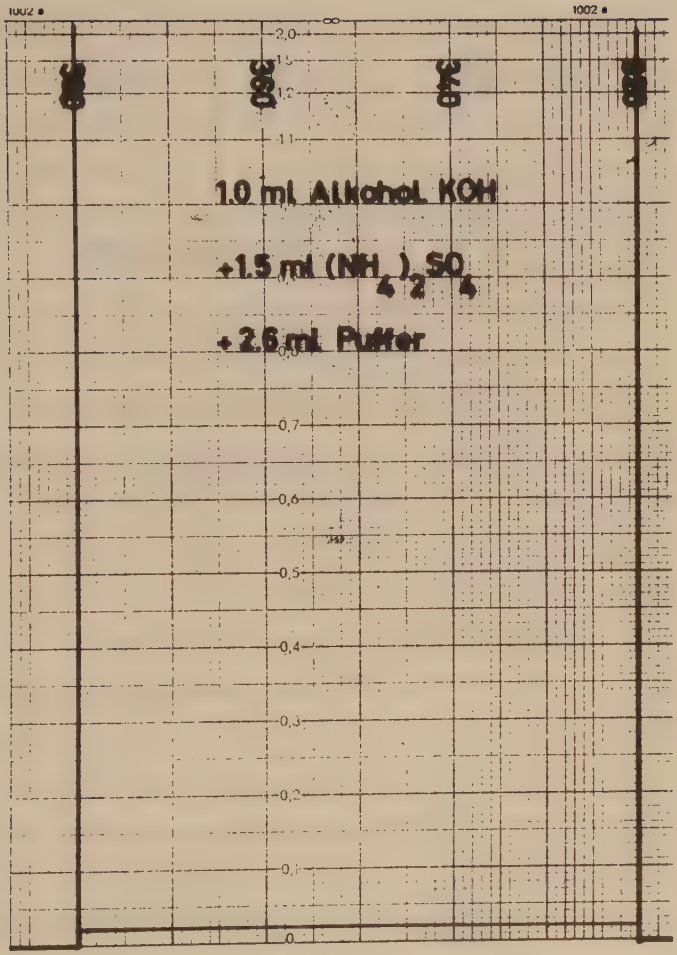


Abb. 24: Messung der spektralen Absorption einer Kombination von alkohol.KOH und $(NH_4)_2SO_4$ entsprechend ihrer Konzentration im Versuchsansatz

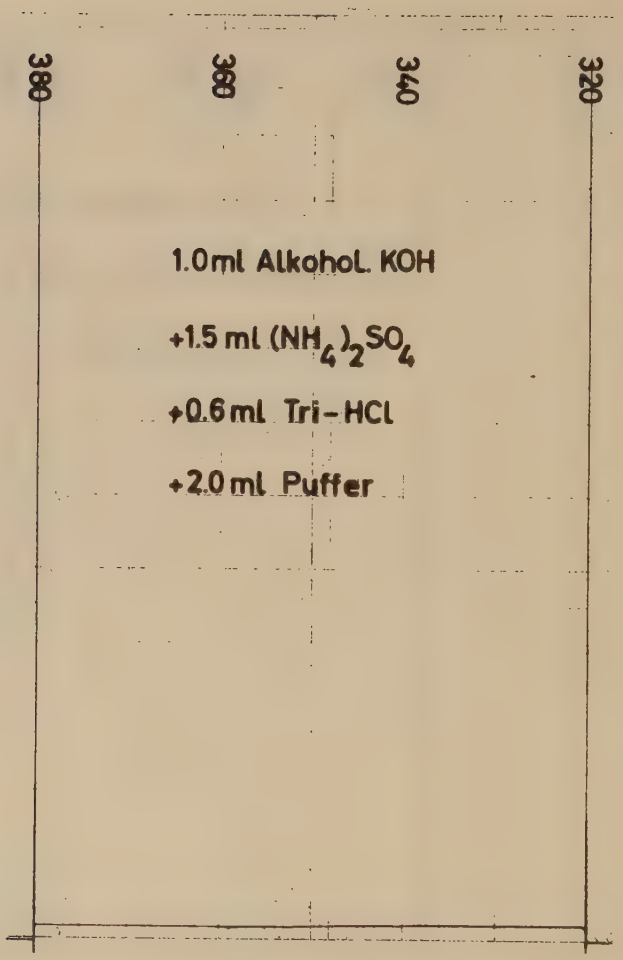


Abb. 25: Messung der spektralen Absorption einer Kombination von alkohol.KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolamin-HCl entsprechend ihrer Konzentration im Versuchsansatz

Aus diesen Messungen ergibt sich, daß die alkoholische KOH eine Eigenextinktion von o.172 hat (Abb. 13). Für den Extinktionsverlauf der alkoholischen KOH zwischen 38o und 32o nm sind möglicherweise Verunreinigungen der KOH und/oder des Äthanols verantwortlich. Die übrigen Substanzen (Abb. 12, 14, 15) haben keine oder nur eine geringe Eigenextinktion. Dihydro-NAD (Abb. 16) zeigt das typische Extinktionsmaximum bei 335 nm. Die Messung der verschiedenen Substanzen in ihren Endkonzentrationen ergibt eine Extinktion von o.o18 für die alkoholische KOH (Abb. 17). Natrium-Pyruvat hat in der Endkonzentration eine Extinktion von o.119 (Abb. 2o). Bei der Messung der übrigen Reaktionsteilnehmer in Endkonzentration finden sich keine oder nur geringe Extinktionen (Abb. 18, 19, 21). Werden die einzelnen Reaktionsteilnehmer entsprechend der KLINGENBERG'schen Vorschrift kombiniert, so ergibt sich für den Ansatz Na-Pyruvat + LDH eine Extinktion von o.14o (Abb. 22), für die übrigen Kombinationen jeweils eine Extinktion von ca. o.o2o (Abb. 23, 24, 25).

In weiteren Untersuchungen sollte festgestellt werden, durch welchen der Reaktionsteilnehmer Dihydro-NAD dahingehend beeinflußt wird, daß es im kinetischen Test nach KLINGENBERG nicht mehr oder nur noch unvollständig nachzuweisen ist. Hierzu wurden Ansätze von Dihydro-NAD-

Eichlösung (1o mg/1oo ml) in m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 mit den verschiedenen an der Aufbereitung beteiligten Substanzen in den kinetischen Test eingebracht:

- Dihydro-NAD-Lösung + m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5
- Dihydro-NAD-Lösung + m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 + $(NH_4)_2SO_4$
- Dihydro-NAD-Lösung + m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 + Triäthanolaminhydrochlorid
- Dihydro-NAD-Lösung + m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 + $(NH_4)_2SO_4$ + alkoholische KOH
- Dihydro-NAD-Lösung + $(NH_4)_2SO_4$ + Triäthanolaminhydrochlorid + alkoholische KOH
- Dihydro-NAD-Lösung + m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5 + alkoholische KOH

Die Ergebnisse der Messung dieser Versuchsansätze sind in Tabelle 11 zusammengestellt, entsprechende graphische Registrierungen der spektralen Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 32o nm sind aus den Abbildungen 26 bis 31 zu ersehen.

Tabelle 11: (Seite 61)

Versuche zur Beeinflussung einer Dihydro-NAD-Pufferlösung im kinetischen Test durch die verschiedenen Reaktionsteilnehmer im Versuchsansatz nach KLINGENBERG (37)

Versuchsansatz	E	E_1	E_2	Δ E	µMol/ml	% Wiederfindung
2.o ml 1o mg% D.-NAD 3.1 ml Puffer	o.278	o.372	o.11o	o.262	o.o421	7o
2.o ml 1o mg% D.-NAD 1.5 ml $(NH_4)_2SO_4$ 1.6 ml Puffer	o.282	o.368	o.142	o.226	o.o36	6o
2.o ml 1o mg% D.-NAD o.6 ml Tri-HCl 2.5 ml Puffer	o.265	o.335	o.11o	o.225	o.o36	6o
2.o ml 1o mg% D.-NAD 1.o ml KOH I 1.5 ml $(NH_4)_2SO_4$ o.6 ml Puffer	o.3oo	o.396	o.326	o.o7o	o.o11	18
2.o ml 1o mg% D.-NAD 1.o ml KOH I 1.5 ml $(NH_4)_2SO_4$ o.6 ml Tri-HCl	o.3o5	o.418	o.358	o.o6o	o.o1o	17
2.o ml 1o mg% D.-NAD 1.o ml KOH I 2.1 ml Puffer	o.3o8	o.425	o.425	o.ooo	o.o	o

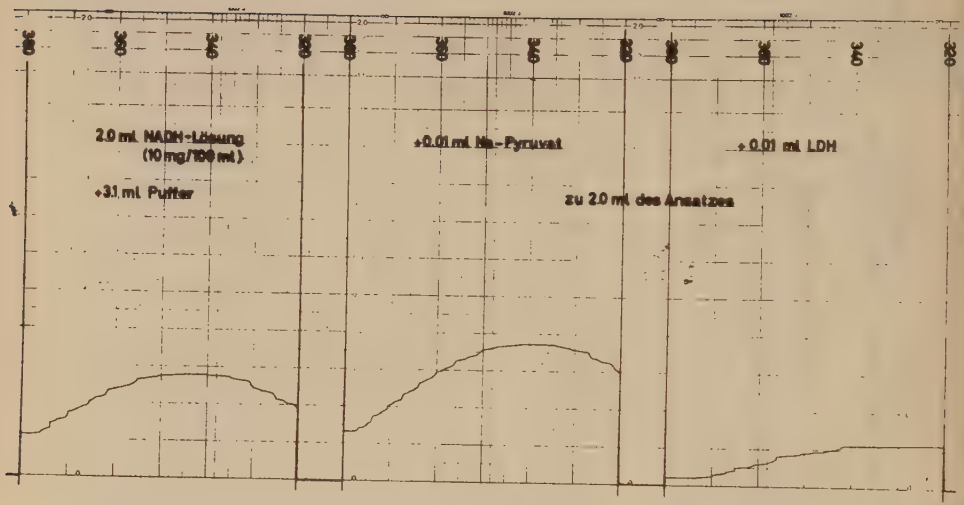


Abb. 26: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung im kinetischen Test

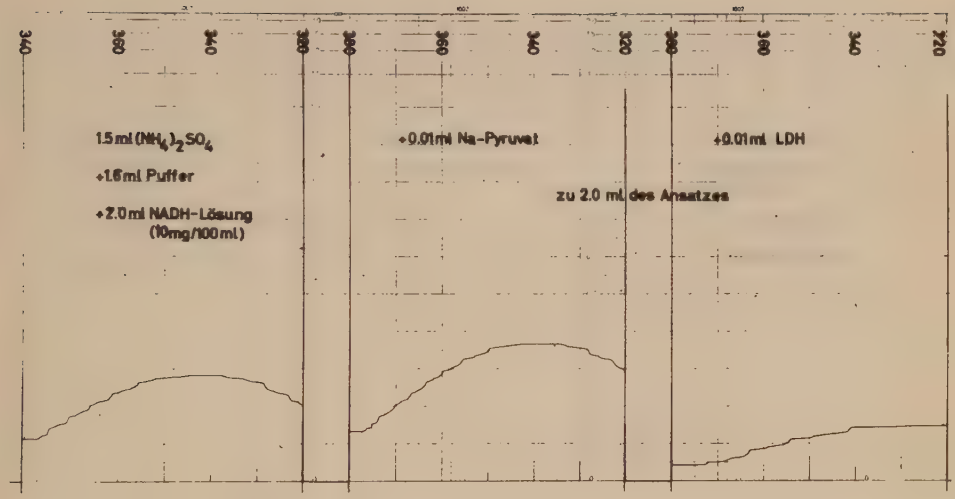


Abb. 27: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung in Kombination mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung im kinetischen Test

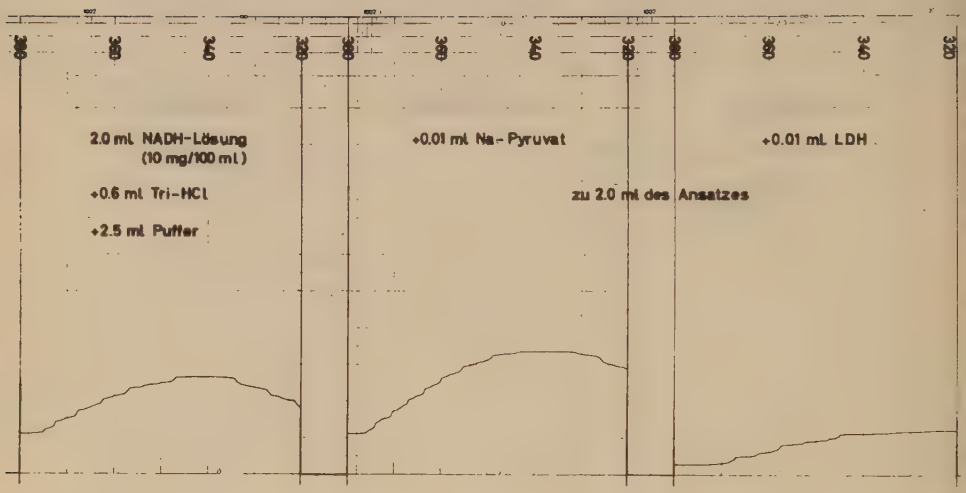


Abb. 28: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung in Kombination mit Triäthanolamin-HCl-Lösung im kinetischen Test

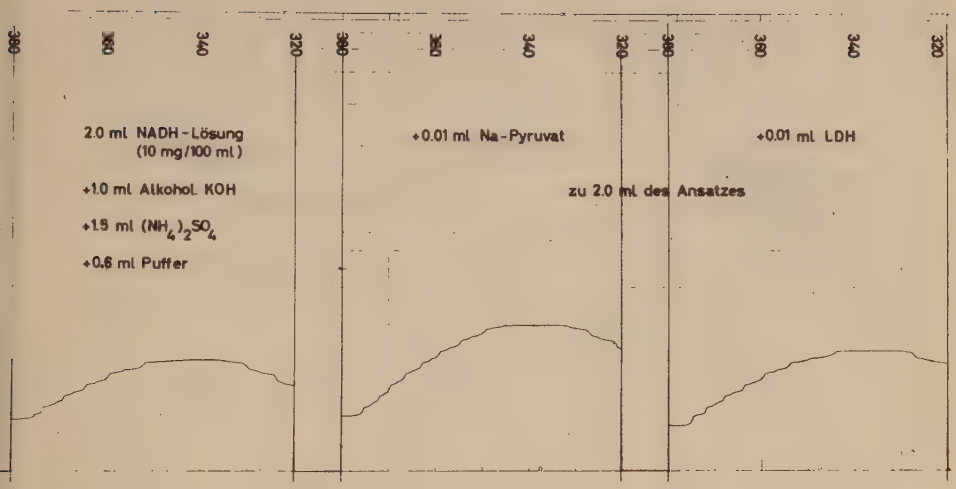


Abb. 29: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung in Kombination mit alkoholischer KOH und $(NH_4)_2SO_4$ im kinetischen Test

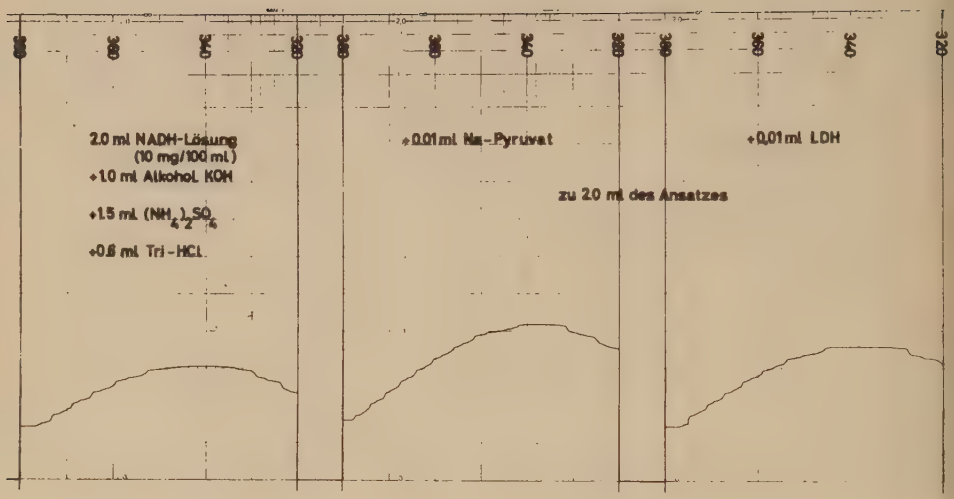


Abb. 3o: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung in Kombination mit alkoholischer KOH, $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolamin-HCl im kinetischen Test

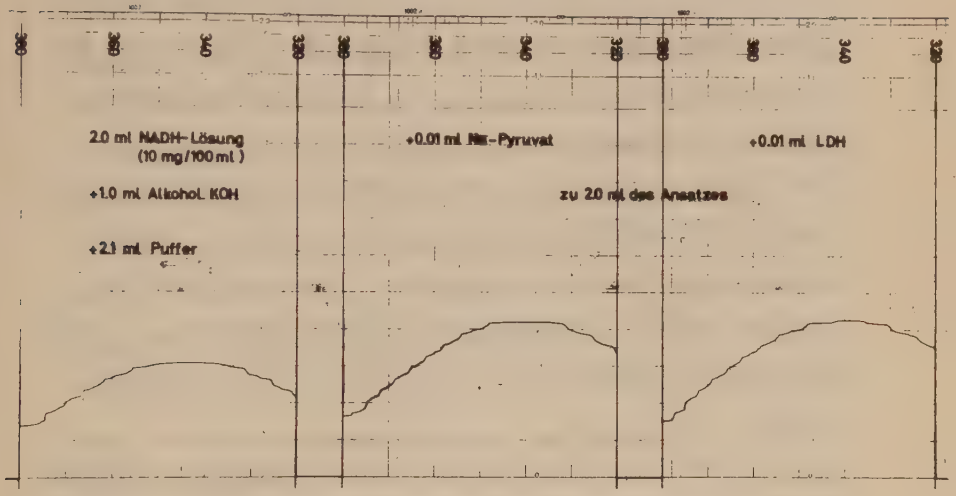


Abb. 31: Messung der spektralen Absorption einer 1o mg/1oo ml enthaltenden Dihydro-NAD-Pufferlösung in Kombination mit alkoholischer KOH im kinetischen Test

Aus der prozentualen Wiederfindung von Dihydro-NAD in diesen Versuchen ist zu ersehen, daß das Co-Substrat bis zu maximal 7o % der zugesetzten Menge wiedergefunden wird. Diese Wiederfindung stimmt mit den früheren Ergebnissen überein und wird erklärt durch die von der Firma Boehringer garantierte Reinheit von

ca. 78 % des Dihydro-NAD-Präparates. Die tabellarische Übersicht zeigt weiter, daß die Wiederfindung von Dihydro-NAD ca. 6o % beträgt, wenn der kinetische Test in Gegenwart von $(NH_4)_2SO_4$ und Triäthanolaminhydrochlorid durchgeführt wird. Eine Wiederfindung von ca. 15 - 2o % ergibt sich, wenn alkoholische KOH in Kombination mit den anderen Reaktionsteilnehmern im kinetischen Test anwesend ist. Wird Dihydro-NAD im kinetischen Test allein in Gegenwart von alkoholischer KOH und Puffer untersucht, so beträgt die Wiederfindung o %.

Als Ursache der beobachteten Beeinflussung des Dihydro-NAD im kinetischen Test müssen demnach vor allem Einflüsse der alkoholischen KOH diskutiert werden.

5. Versuche zur Dihydro-NAD-Bestimmung mit gereinigter KOH

Im Zusammenhang mit der Beeinflussung des Dihydro-NAD im kinetischen Test durch die alkoholische KOH und der früher beobachteten hohen Eigenextinktion dieser Lauge erschien es sinnvoll, eine eventuelle Verunreinigung der alkoholischen KOH auszuschalten. In den folgenden Versuchen wurde eine gereinigte alkoholische KOH verwendet. Die Herstellung einer solchen gereinigten alkoholischen KOH erfolgte nach der Vorschrift von

PETERSON (42), die im folgenden sinngemäß wiedergegeben wird: 7 Gramm Silbernitrat und 15 Gramm Kaliumhydroxyd werden getrennt in je 1oo ml Äthylalkohol gelöst. Beide Lösungen werden zu 4 l absoluten Äthylalkohols gegeben und vermischt. Nach Stehen über Nacht wird das Gemisch über eine Vigreux-Säule destilliert. 7oo ml Vorlauf werden verworfen, ebenso die letzten 1oo ml. Die Wirksamkeit dieser Destillation wird durch Zusatz von schwefelsaurem Phenylhydrazin zum gereinigten Äthanol geprüft. Innerhalb ca. 12 Stunden darf sich beim Stehen bei Raumtemperatur in dem Gemisch keine Farbe entwickeln.

Die Messung der spektralen Absorption im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 32o nm einer solchen mit destilliertem Äthanol hergestellten 1 N alkoholischen KOH ist aus Abb. 32 zu ersehen. Beim Vergleich der Abbildungen 32 und 13 ergibt sich, daß die Äthanol-Destillation einen deutlichen Einfluß auf die spektrale Absorption im genannten Bereich hat: Die Eigenextinktion der so hergestellten 1.o N alkoholischen KOH beträgt o.o58 gegenüber einer Extinktion von o.172 der früher benutzten KOH. Untersuchungen von Dihydro-NAD im kinetischen Test mit dieser gereinigten alkoholischen KOH sind in Tabelle 12 zusammengestellt.

1.o	ml	alkohol. KOH	1.o	ml	alkohol. KOH
2.o	ml	1o mg% Dihydro-NAD-Lösung	2.o	ml	1o mg% Dihydro-NAD-Lösung
2.1	ml	Puffer	1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$
			o.6	ml	Tri-HCl

$E_{\lambda 34o\ nm}$	o.27o	o.33o
E_1	o.368	o.43o
E_2	o.368	o.31o
ΔE	o.ooo	o.12o
%	o	32
Dihydro-NAD [uMol/ml]	o	o.o19

Tabelle 12: Untersuchungen von Dihydro-NAD im kinetischen Test mit nach der Vorschrift von PETERSON (42) gereinigter alkoholischer KOH

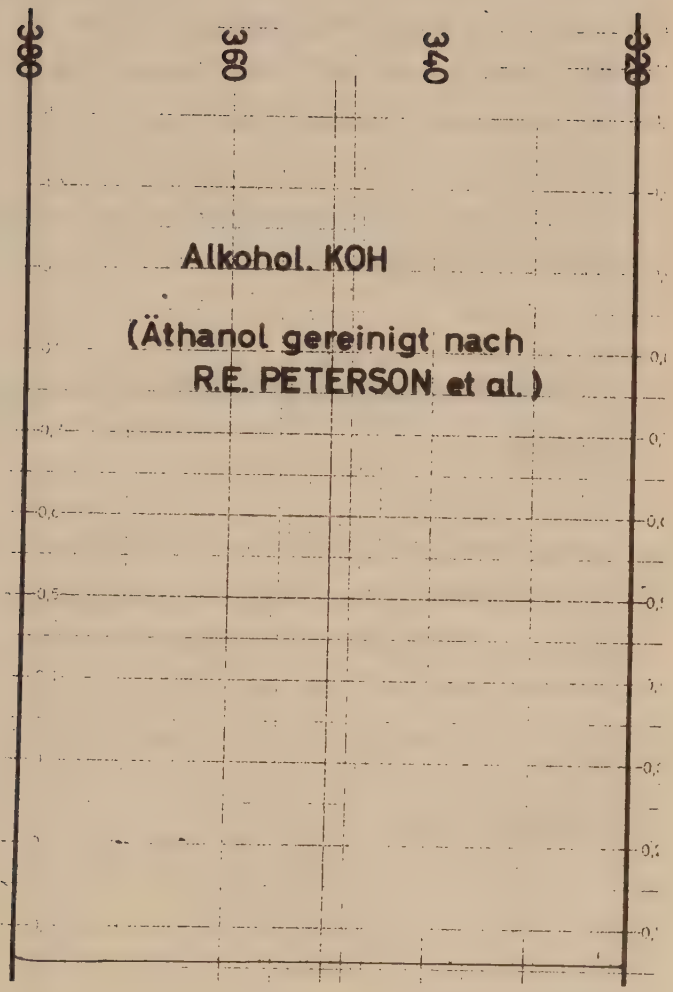


Abb. 32: Messung der spektralen Absorption einer mit destilliertem Äthanol nach PETERSON (42) hergestellten 1.o N KOH

Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß die Verwendung von destilliertem Äthanol bei der Herstellung der alkoholischen KOH keinen wesentlichen Einfluß auf die prozentuale Wiederfindung von Dihydro-NAD hat. Im Vergleich mit der ursprünglich benutzten alkoholischen KOH ist jedoch die Wiederfindung von ca. 3o % gegenüber 15 - 2o % bemerkenswert.

6. Versuche zur Dihydro-NAD-Bestimmung mit alkoholischer NaOH

In weiteren Versuchen sollte nun geklärt werden, ob bei Verwendung einer anderen Lauge ähnliche Ergebnisse zu beobachten sind. Hierzu wurde eine 1 N alkoholische NaOH mit nach PETERSON (42) gereinigtem Äthanol hergestellt. Untersuchungen von Dihydro-NAD im kinetischen Test mit dieser NaOH sind in Tabelle 13 zusammengestellt.

1.o	ml	alkohol. NaOH	1.o	ml	alkohol. NaOH
2.o	ml	1o mg% Dihydro-NAD-Lösung	2.o	ml	1o mg% Dihydro-NAD-Lösung
2.1	ml	Puffer	1.5	ml	$(NH_4)_2SO_4$
			o.6	ml	Tri-HCl

$E_{\lambda\ 34o\ nm}$	o.33o	o.335
E_1	o.43o	o.429
E_2	o.43o	o.36o
ΔE	o.ooo	o.o69
%	o	21
Dihydro-NAD [uMol/ml]	o	o.o11

Tabelle 13: Untersuchungen von Dihydro-NAD im kinetischen Test mit nach der Vorschrift von PETERSON (42) gereinigter NaOH

Aus den Ergebnissen ist zu ersehen, daß durch die Verwendung von alkoholischer NaOH statt alkoholischer KOH keine bessere prozentuale Wiederfindung erreicht wird.

7. Versuche zur pH-Situation bei der Dihydro-NAD-Bestimmung

Als mögliche Ursache der im kinetischen Test beobachteten Beeinflussung des Dihydro-NAD müssen Einflüsse der Wasserstoffionenkonzentration diskutiert werden. Hierzu wurden vergleichende pH-Messungen auf verschiedenen Stufen des Versuchsansatzes nach KLINGENBERG durchgeführt. Es wurden Versuchsansätze mit 12 mg/1oo ml enthaltender Dihydro-NAD-Pufferlösung (m/15 Sörensen-Puffer pH 7.5) sowie Versuchsansätze mit Blut untersucht (Tab. 14).

I. Stufe des Versuchsansatzes

4.o ml 12 mg% Dihydro-NAD-Pufferlösung	pH = 13.35	2.o ml Blut	pH = 9
2.o ml alkohol. KOH	pH = 13.35	1.o ml alkohol.KOH	

II. Stufe des Versuchsansatzes

4.o ml 12 mg% Dihydro-NAD-Pufferlösung		2.o ml Blut	
2.o ml alkohol. KOH	pH = 8.75	1.o ml alkohol.KOH	pH = 8,68
3.o ml $(NH_4)_2SO_4$	pH = 8.75	1.5 ml $(NH_4)_2SO_4$	

III. Stufe des Versuchsansatzes

4.o ml 12 mg% Dihydro-NAD-Pufferlösung		2.o ml Blut	
2.o ml alkohol. KOH	pH = 8.52	1.o ml alkohol.KOH	pH = 8.4o
3.o ml $(NH_4)_2SO_4$	pH = 8.5o	1.5 ml $(NH_4)_2SO_4$	
1.2 ml Tri-HCl		o.6 ml Tri-HCl	

Tabelle 14: Versuche zur pH-Situation bei der Herstellung eines Versuchsansatzes zur Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37)

Es zeigt sich, daß in Versuchsansätzen mit Vollblut der pH-Wert während des ganzen Versuches zwischen ca. 9.o und 8.4 liegt, während in Versuchsansätzen mit Dihydro-NAD-Eichlösung auf der ersten Versuchsstufe ein pH-Wert von 13.35 registriert wurde. Diese Divergenz ist durch die große Pufferkapazität des Blutes zu erklären.

Diese pH-Messungen zeigen, daß während des ganzen Verlaufes der Untersuchung ein pH-Wert von 8 niemals unterschritten wird, allerdings wird auch der von KLINGENBERG (37) geforderte pH von "ca. 7.8" nicht erreicht. Eine Zerstörung des Co-Substrats bei diesen pH-Werten ist nicht möglich, da Dihydro-NAD nach HOLZER (43) alkalistabil ist.

G. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird über Versuche zur Einführung einer Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut in die klinisch-chemische Routinediagnostik berichtet.

Wegen der Praktikabilität im Routinelaboratorium wurde bei der Auswahl des Verfahrens der enzymatisch-photometrischen Blut-Dihydro-NAD-Bestimmung nach KLINGENBERG (37) der Vorzug gegeben. Die KLINGENBERG'sche Methode ist neben einer Vielzahl von Verfahren zur enzymatisch-photometrischen Bestimmung von Dihydro-NAD in Gewebeextrakten das einzige bisher publizierte enzymatisch-photometrische Verfahren zur Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut (Literaturübersicht bis Ende 1967). Fluorometrische Methoden zur Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut wurden in der vorliegenden Untersuchung nicht berücksichtigt.

Erste orientierende Untersuchungen mit dem Verfahren nach KLINGENBERG (37) ergaben (F/I.), daß bei der Aufarbeitung des Blutes unvorhersehbar Haemolyse der Erythrocyten auftritt und nach vollständiger oxydativer Umwandlung des Dihydro-NAD in NAD neben Extinktionszunahmen nicht reproduzierbare geringe Extinktionsabnahmen gemessen werden.

Die Technik der venösen Blutentnahme hatte keinen Einfluß auf die Entwicklung einer Haemolyse während der Aufbereitung. Die normale Dihydro-NAD-Konzentration im Blut liegt nach LÖHR und WALLER (44) bei 4.6 /uMol/l oder o.oo46 /uMol/ml. Die von den Autoren zitierten Untersuchungen wurden im KLINGENBERG'schen Laboratorium ausgeführt. In Untersuchungen mit dem kinetischen Test nach KLINGENBERG (37) (2.o ml Blutextrakt + o.o1 ml Na-Pyruvat + o.o1 ml LDH) würde dieser Konzentration von o.oo46 /uMol/ml eine theoretische Extinktionsabnahme von o.o45 entsprechen. Die photometrische Messung der im Blut zu erwartenden Dihydro-NAD-Konzentration ist demnach möglich. 1957 wurde von STROHMEYER (45) aus dem Physiologisch-Chemischen Institut und der I. Medizinischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf mitgeteilt, daß die Bestimmung von Dihydro-NAD im Blut wegen der zu geringen Konzentrationen bisher nicht möglich war. Eine ähnliche Feststellung wurde von REINAUER (46) 1964 getroffen.

Weitere Untersuchungen in unserem Laboratorium ergaben (F/II/1a/1b), daß Dihydro-NAD, welches zu Blut und zu Blutextrakten zugesetzt wurde, im kinetischen Test nach KLINGENBERG dahingehend verändert wird, daß die zu erwartenden Extinktionsabnahmen durch vollständige oxydative Umwandlung des Dihydro-NAD nicht mehr oder mit

unreproduzierbaren niedrigen Werten gemessen werden. Bei der Untersuchung von Dihydro-NAD-Pufferlösung (F/II/1c) ergab sich eine prozentuale Wiederfindung von 14 - 24 %.

Weiterführende Untersuchungen mit Dihydro-NAD-Pufferlösung (F/II/2) ohne Zusätze von jenen Chemikalien, die in dem Verfahren von KLINGENBERG zur Blutaufbereitung verwendet werden, erbrachten eine Wiederfindung von ca. 8o %. Diese prozentuale Wiederfindung ist durch die Reinheit von ca. 78 % des käuflichen Dihydro-NAD-Präparates (BOEHRINGER) erklärt.

Bei der weiteren Fehlersuche wurden Untersuchungen mit jenen Chemikalien, die im KLINGENBERG'schen Verfahren zur Blutaufbereitung Verwendung finden, durchgeführt (F/II/3/4). Dabei ergab sich, daß Dihydro-NAD vor allem durch die verwendete alkoholische KOH in der beschriebenen Weise beeinflußt wird.

Der Gebrauch von durch Destillation nach PETERSON (42) gereinigtem Äthanol zum Ansetzen der alkoholischen KOH bedingte eine deutliche Änderung der spektralen Absorption von alkoholischer KOH im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 32o nm (F/II/5). Die mit dieser alkoholischen KOH durchgeführten Dihydro-NAD-Bestimmungen (F/II/5) ergaben eine Wiederfindung von 32 %. In entsprechenden Versuchen mit einer alkoholischen NaOH

(Äthanol nach PETERSON (42)) wurde eine Wiederfindung von 21 % erhalten (F/II/6).

Es ist daher festzustellen, daß durch die verwendeten Laugen im kinetischen Test nach KLINGENBERG Dihydro-NAD zum größten Teil dahingehend verändert wird, daß nur geringe Extinktionsabnahmen durch vollständige oxydative Umwandlung von Dihydro-NAD in NAD gemessen werden. Die spektrale Absorption des gemessenen Versuchsansatzes im Wellenlängenbereich zwischen 38o und 32o nm ist nach Ablauf der Reaktion unverändert.

Durch pH-Messungen auf verschiedenen Stufen des methodischen Vorgehens (F/II/7) konnte gezeigt werden, daß ein pH von ca. 8 nicht unterschritten wird. Eine Zerstörung des Dihydro-NAD bei diesen pH-Werten ist nicht möglich, da Dihydro-NAD nach HOLZER (43) alkalistabil ist.

Als mögliche Ursache für die beschriebene Veränderung des Dihydro-NAD im kinetischen Test müssen Redoxreaktionen mit im alkalischen Bereich löslichen Metallen diskutiert werden.

H. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wird über eigene Erfahrungen mit der enzymatisch-photometrischen Dihydro-NAD-Bestimmung im Blut nach KLINGENBERG berichtet.

Eine Einführung dieser Methode in die klinisch-chemische Routinediagnostik ist wegen nicht reproduzierbarer Einzelbestimmungen und einer unzureichenden prozentualen Wiederfindung nicht gelungen.

Als mögliche Ursache für die festgestellte Beeinflussung des Dihydro-NAD während der Aufbereitung von Blut wird die Reinheit der Chemikalien, insbesondere die Reinheit der alkoholischen KOH, diskutiert. Diese Ergebnisse wurden durch Untersuchungen von Dihydro-NAD-Pufferlösung im kinetischen Test nach KLINGENBERG erhalten. Angaben über die normale Konzentration von Dihydro-NAD im Blut können nicht gemacht werden.

I. LITERATURVERZEICHNIS

(1) HARDEN und YOUNG — zit. nach MYRBÄCK, K. Co-Zymase. Ergebnisse der Enzymforschung, II. Band, Akademische Verlagsgesellschaft M.B.H. Leipzig 1933, S.139

(2) EULER, H.v. und MYRBÄCK, K. — Gärungs-Co-Enzym (Co-Zymase) der Hefe. II. Z.physiol.Ch. 131 (1923) 18o

(3) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. — Über Aktivierung der Robisonschen Hexose-Mono-Phosphorsäure in roten Blutzellen und die Gewinnung aktivierender Fermentlösungen. Biochem.Z. 242 (1931) 2o6

(4) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. — Über ein neues Osydationsferment und sein Absorptionsspektrum. Biochem.Z. 254 (1932) 438

(5) WARBURG, O. und CHRISTIAN, W. — Co-Fermentproblem. Biochem.Z. 275 (1935) 464

(6) WARBURG, O., CHRISTIAN, W. und GRIESE, A. — Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise. Biochem.Z. 282 (1935) 157

(7) WARBURG, O., CHRISTIAN, W. und GRIESE, A. — Die Wirkungsgruppe des Co-Ferments aus roten Blutzellen. Biochem.Z. 279 (1935) 143

(8) KARLSON, P. — Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. Dritte, überarbeitete und erweiterte Auflage. Georg Thieme Verlag Stuttgart 1962

(9) DIXON, M.
Reports: Nomenclature of the Nicotinamide Nucleotide Coencymes
Science 132 (1960) 1548

(10) TALALAY, P., LOEWUS, F.A. and VENNESLAND, B.
The Encymatic Transfer of Hydrogen
IV. The Reaction catalyzed by a ß-Hydroxysteroid Dehydrogenase
J.biol.Chem. 212 (1955) 801

(11) LEVY, H.R., GRAVES, J.L. and VENNESLAND, B.
Hydrogen transfer in DPN - linked Enzyme reactions
Fed.Proc. 15 (1956) 300

(12) LEUTHARDT, F.
Lehrbuch der Physiologischen Chemie
14. Auflage
Berichtigter Nachdruck 1961
Walter de Gruyter & Co., Berlin 1961

(13) KAPLAN, N.O., COLOWICK, S.P., NEUFELD, E.F.
Pyridine Nucleotide Transhydrogenase
III. Animal tissue Transhydrogenases
J.biol.Chem. 205 (1953) 1

(14) RAPOPORT, S.M.
Medizinische Biochemie
VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1964

(15) BOXER, G.E. and DEVLIN, Th.M.
Pathways of Intracellular Hydrogen Transport
Science 134 (1961) 1495

(16) KAPLAN, N.O., COLOWICK, S.P., ZATMAN, L.J., CIOTTI, M.M.
Pyridine Nucleotide Transhydrogenase
V. Exchange Reactions studied with C^{14}
J.biol.Chem. 205 (1953) 31

(17) MARTIUS, C. und STRUFE, R.
Phyllochinonreduktase (vorläufige Mitteilung)
Biochem.Z. 326 (1954) 24

(18) WOSILAIT, W.D. and NASON, A.
Pyridine Nucleotide - Quinone Reductase.
I. Purification and Properties of the Enzyme from Pea Seeds
J.biol.Chem. 2o6 (1954) 255

(19) WOSILAIT, W.D., NASON, A. and TERRELL, A.J.
Pyridine Nucleotide - Quinone Reductase.
II. Role in Electron Transport
J.biol.Chem. 2o6 (1954) 271

(2o) NASON, A. and LEHMANN, I.R.
Tocopherol as an Activator of Cytochrome c Reductase
Science 122 (1955) 19

(21) BRIGGS, M.H.
Vitamin and Coenzyme Content of Hepatomas induced by Butter Yellow
Nature (Lond.) 187 (196o) 249

(22) BOLT, W., RITZI, F., TOUSSAINT, R. und ZERLETT, G.
Der Diphosphopyridinnucleotid-Blutspiegel als Kriterium für eine gesteuerte Dosierung der Cytostatica E 39 und Endoxan bei inoperablen Tumorkranken
Klin.Wschr. 38 (196o) 71

(23) KRÖGER, H., ROTTHAUWE, W., ULRICH, B. und HOLZER, H.
Zum Einfluß von Carcinostatica auf den DPN-Stoffwechsel der Tumoren.
I. Einbau von ^{14}C-Ribose und ^{14}C-Nicotinsäureamid in das DPN von Asciteszellen
Biochem. Z. 333 (196o) 148

(24) KRÖGER, H., ROTTHAUWE, W., ULRICH, B. und HOLZER, H.

Zum Einfluß von Carcinostatica auf den DPN-Stoffwechsel in Tumoren.
II. Nachweis von DPN-Bausteinen in Asciteszellen
Biochem.Z. 333 (1960) 155

(25) EHRHART, H. und SCHEFFEL, G.

Untersuchungen über den Leukocytenstoffwechsel.
Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)-Gehalt normaler und leukämischer Leukocyten des Menschen
Klin.Wschr. 43 (1965) 317

(26) KRÖGER, H., ULRICH, B. und HOLZER, H.

Wirkung carcinostatischer Verbindungen auf die Konzentration von Diphosphopyridinnucleotid in Tumoren
Arzneimittel-Forsch. 9 (1959) 598

(27) HOLZER, H., DUNTZE, W. und FRANK, S.

Zum carcinostatischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-Verbindungen: Alkylierung von Nicotinsäureamid am Pyridin-Stickstoff
Angew.Chem. 70 (1958) 746

(28) WIELAND, O., MATSCHINSKY, F., LÖFFLER, G., MÜLLER, U.

Die Abhängigkeit der Ketonkörperbildung der Leber vom DPNH-Spiegel
Biochim.biophys.Acta (Amst.) 53 (1961) 412

(29) THÖLEN, H., BIGLER, F., HEUSLER, A. und STAUB, H.

Therapie des Leberkomas mit Coenzym A, α-Liponsäure und Diphosphopyridinnucleotid
Dtsch.med.Wschr. 87 (1962) 2488

(30) FRANK, S. und NASSE, H.

Die Biosynthese und klinische Bedeutung des Coenzyms DPN
Med.Welt (Berl.) 42 (1961) 96

(31) CHANCE, B. and SCHOENER, B.
Correlation of Oxidation - Reduction Changes of Intracellular Reduced Pyridine Nucleotide and Changes in Electroencephalogram of the Rat in Anoxia
Nature (Lond.) 195 (1961) 956

(32) HOHORST, H.J., KREUTZ, F.H., REIM, M.
Steady State Equilibria of Some DPN - linked Reactions and the Oxidation/ Reduction State of the DPN/DPNH System in the Cytoplasmatic Compartment of Liver Cells in vivo
Biochem.biophys.Res.Commun. 4 (1961) 159

(33) GLOCK, G.E. and MC LEAN, P.
The Determination of Oxidized and Reduced Diphosphopyridine Nucleotide and Triphosphopyridine Nucleotide in Animal Tissues
Biochem.J. 61 (1955) 381

(34) LOWRY, O.H., PASSONNEAU, J.V., SCHULZ, D.W. and ROCK, M.K.
The Measurement of Pyridine Nucleotides by Enzymatic Cycling
J.biol.Chem. 236 (1961) 2746

(35) VILLEE, C.A.
An Enzymatic Method for the Assay of Pyridine Nucleotides in Extracts of Animal Tissues
Biochem.J. 83 (1962) 191

(36) HOLZER, H., BUSCH, D. und KRÖGER, H.
Enzymatisch-optische Bestimmung von TPNH und TPN neben DPNH und DPN in Leberextrakten
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 313 (1958) 184

(37) KLINGENBERG, M.
Diphospho-pyridinnucleotid
Enzymat.Analyse
herausgegeben von
H.U. BERGMEYER
Verlag Chemie 1962

(38) JACOBSON, K.B. and ASTRACHON, L.
Specific Methods for the Microdetermination of Pyridine Nucleotide Enzymes
Arch.Biochem. 71 (1957) 69

(39) BASSHAM, J.A., BIRT, L.M., HEMS, R. and LOENING, U.E.
Determination of the Reduced and oxidized Pyridine Nucleotides in Animal Tissues
Biochem.J. 73 (1959) 491

(4o) LOWRY, O.H., ROBERTS, N.R. and KAPPHAHN, J.J.
The fluorometric Measurement of Pyridine Nucleotides
J.biol.Chem. 224 (1957) 1o47

(41) BRUNS, F.H., WERNERS, P.H.
Dehydrogenases: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase, 6-Phosphogluconate Dehydrogenase, Glutathione Reductase, Methemoglobin Reductase, Polyol Dehydrogenases
Advanc.clin.Chem. 5 (1962) 237

(42) PETERSON, R.E., KARRER, A. and GUERRA, S.L.
Evaluation of Silber-Porter Procedure for Determination of Plasma Hydrocortisone
Analyt.Chem. 29 (1957) 144

(43) HOLZER, H., GOLDSCHMIDT, S., LAMPRECHT, W. und HELMREICH, E.
Bestimmung stationärer Zwischenstoffkonzentrationen.
I. Bestimmung stationärer DPN/DPNH-Konzentrationen in lebenden Zellen und Geweben
Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 297 (1954) 1

(44) LÖHR, G.W. und WALLER, H.D.
Biochemie und Pathogenese der Enzymopenischen Hämolytischen Anämien
Dtsch.med.Wschr. 86 (1961) 27

(45) STROHMEYER, G., MARTINI, G.A. und KLINGMÜLLER, V.

Veränderungen von α-Ketoglutarsäure, Brenztraubensäure und Diphosphopyridinnucleotid bei chronischen Leberkranken

Klin.Wschr. 25 (1957) 385

(46) REINAUER, H. und BRUNS, H.

Fluorometrische Bestimmung der hydrierten Pyridinnucleotide im menschlichen Blut

Hoppe-Seylers Z.physiol.Chem. 337 (1964) 93

Herrn Prof. Dr. med. F. Doenecke danke ich für die Erlaubnis, an seiner Klinik zu arbeiten.

Herrn Priv.Doz. Dr. med. W. Leppla danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung mit wichtigen Ratschlägen bei der Ausführung der Arbeit.

Ebenfalls danke ich Herrn Dipl.-Chem. Dr.rer. nat. H.E. Keller und Herrn Dr. med. B. Hoffsümmer für ihre Hilfe bei der Durchführung der Versuche und der Gestaltung der Arbeit.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. med. G. Werth für die Möglichkeit, mit ihr über das Problem der vorliegenden Arbeit zu diskutieren.

LEBENSLAUF

Am 28.9.1941 wurde ich als Tochter des Kaufmanns Ludwig Mang und seiner Ehefrau Paula, geb. Schild, in Saarbrücken geboren. Mein Vater fiel 1943 in Rußland. Von September 1947 bis 1952 besuchte ich die Katholische Volksschule in Riegelsberg/Saar, von Herbst 1952 bis Dezember 1954 die Mädchenmittelschule in Saarbrücken und anschließend bis März 1961 die Marienschule, Mädchenrealgymnasium, in Saarbrücken. An dieser Schule legte ich am 7.3.1961 die Reifeprüfung ab.

Im Sommersemester 1961 begann ich das Studium der Medizin an der Universität des Saarlandes. In Homburg/Saar legte ich im Oktober 1963 die ärztliche Vorprüfung und am 26.7.1967 die ärztliche Prüfung ab.

Vom 1.1o.1967 bis 31.12.1967 war ich als Medizinalassistentin an der I. Medizinischen Universitätsklinik in Homburg/Saar tätig, vom 1.1.1968 bis 15.7.1968 an der Chirurg.Abteilung und anschließend an der Geburtshilfl.-Gynaekolog.Abteilung der St. Elisabeth-Klinik in Saarlouis. Seit 1.1.1969 arbeite ich wieder als Medizinalassistentin an der I.Med.Univ.-Klinik in Homburg.

Am 1o.12.1968 heiratete ich den Kinderarzt Dr. med. Ramez Manavi und erwarb zu der deutschen auch die iranische Staatsangehörigkeit.

ROTAPRINT-
OFFSET-
DRUCKEREI

Klein

6602 DUDWEILER Scheidter Straße 26
Tel. Sulzbach 7 32 84

IHR LIEFERANT FÜR DRUCKSACHEN ALLER ART